

**Die Bedeutung der GRAS-Proteine für die Entwicklung von Pflanzen
untersucht am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana***



**Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilian-Universität München**

vorgelegt von

Petra Ziemer

30. April 2008

- 1. Gutachterin: Frau PD Dr. Cordelia Bolle**
- 2. Gutachterin: Frau PD Dr. Angelika Böttger**

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2008

.....für Rainer

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Die GRAS-Protein-Familie	3
2.1.1 Strukturelle Merkmale der GRAS-Proteine	4
2.1.2 Bisherige Kenntnisse über GRAS-Proteine	5
2.2 Phytohormone und Signaltransduktion	7
2.2.1 Auxin	8
2.2.2 Ethylen	10
2.2.2.1 Interaktion zwischen Ethylen und Glukose	10
2.2.3 Abscissinsäure	11
2.3 Einfluss der Meristeme auf postembryonales Wachstum	12
2.3.1 Das SAM ändert seine Identität nach der Blühinduktion	12
2.3.2 Einfluss des RAM auf die Wurzelentwicklung	12
2.3.3 Entwicklung von Seitenwurzeln	13
2.4 Architektur der Pflanzen	13
2.4.1 Phyllotaxis der Pflanzen	13
2.4.2 Transition und Blühinduktion bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.4.3 Entwicklung von Hochrosetten	15
2.4.4 Mutanten mit verminderter Anzahl an Verzweigungen	15
2.4.5 Mutanten mit erhöhter Anzahl an Verzweigungen	16
2.5 Zielsetzung dieser Arbeit	17
3 Ergebnisse	18
3.1 Expressionsanalysen der Gene <i>SCL8</i> , <i>23</i> und <i>31</i>	18
3.1.1 Die Promotor- <i>GUS</i> -Fusionen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
3.1.1.1 <i>SCL8</i> -Promotor- <i>GUS</i> -Fusionen	18
3.1.1.1.1 <i>SCL8</i> -Promotor- <i>GUS</i> -Linien unter Einfluß von ABA	21
3.1.1.2 <i>SCL23</i> -Promotor- <i>GUS</i> -Fusionen	22
3.1.1.3 <i>SCL31</i> - Promotor- <i>GUS</i> -Fusionen	23
3.1.2 Expressionsanalysen mit Hilfe von Microarray-Technik	25
3.1.2.1 Expressionsanalysen des <i>SCL8</i> Gens mittels Microarray-Technik	26

3.1.2.1.1 Einfluss von ABA auf die Expression von <i>SCL8</i>	26
3.1.2.2 Expressionsanalysen des <i>SCL23</i> Gens mittels Microarray-Technik	27
3.1.2.2.1 Einfluss verschiedener Stressoren auf die Expression von <i>SCL23</i>	28
3.1.2.3 Expressionsanalysen des <i>SCL31</i> Gens mittels Microarray-Technik	29
3.2 Isolation homozygoter Mutanten und der Überexpressionslinien	30
3.2.1 Nachweis der Insertion in den Mutanten mittels PCR	30
3.2.2 Nachweis der mRNA in Mutanten und Überexpressionslinien durch RT-PCR	31
3.2.2.1 Nachweis der mRNA in <i>sc/8</i> und <i>35S::SCL8</i>	31
3.2.2.2 Nachweis der mRNA in <i>sc/23</i> und <i>35S::SCL23</i>	33
3.2.2.3 Nachweis homozygoter <i>sc/31</i> Mutanten	34
3.3 Komplementation der Mutanten <i>sc/8</i> , <i>23</i> und <i>31</i>	36
3.4 Phänotypische Beschreibung der Mutanten <i>sc/8</i> , <i>23</i> und <i>31</i> sowie der Überexpressionslinien	
<i>35S::SCL8</i> , <i>-23</i> und <i>-31</i>	37
3.4.1 Charakterisierung der <i>sc/8</i> Mutanten und der Überexpressionslinie <i>35S::SCL8</i>	37
3.4.1.1 Keimlinge der <i>sc/8</i> Mutanten	37
3.4.1.2 Wurzelphänotyp der <i>sc/8</i> Mutanten	38
3.4.1.3 Länge der Primärwurzeln	39
3.4.1.4 Anzahl der Lateralwurzeln	39
3.4.1.5 Veränderungen der Phyllotaxis bei <i>sc/8</i> und <i>35S::SCL8</i>	40
3.4.1.6 Erhöhte Anzahl von Seitentrieben in <i>sc/8</i> und <i>35S::SCL8</i>	41
3.4.1.7 Verminderte Repression der Seitenmeristeme der Überexpressionslinie <i>35S::SCL8</i>	45
3.4.1.8 Entwicklung von Hochrosetten an Pflanzen der <i>sc/8-2</i> Mutante	46
3.4.1.9 Bildung partieller Hochrosetten in der Überexpressionslinie <i>35S::SCL8</i>	47
3.4.1.10 Veränderter Blühzeitpunkt der Linien <i>sc/8</i> und <i>35S::SCL8</i>	48
3.4.1.11 Länge der Pflanzen	49
3.4.1.12 Verlust apikaler Dominanz in der <i>35S::SCL8</i> Überexpressionslinie	49
3.4.1.13 Die Schoten der Überexpressionslinie <i>35S::SCL8</i>	50
3.4.1.14 Anzahl der Seitensprosse unter Einwirkung von NAA	51
3.4.1.15 Einfluss von Auxin auf die Organogenese	52
3.4.1.16 Nachweis von Auxin durch das DR5-Element	54
3.4.1.17 Vergleich der Expressionsrate von <i>SCL8</i> , <i>AXR1-12</i> und <i>ABI1</i>	55

3.4.2 Charakterisierung der <i>sc/23</i> Mutanten und der Überexpressionslinie 35S:: <i>SCL23</i>	56
3.4.2.1 Vergleich der Expressionsrate von <i>SCL23</i> und <i>SCR</i>	56
3.4.2.2 Hypokotylllänge der <i>sc/23</i> Mutanten und der Überexpressionslinie 35S:: <i>SCL23</i> ...	57
3.4.2.3 Wurzellänge der <i>sc/23</i> Mutanten und der Überexpressionslinie 35S:: <i>SCL23</i>	58
3.4.2.4 Keimung auf Paclobutrazol	59
3.4.3 Charakterisierung der <i>sc/31</i> Mutanten und der Überexpressionslinie 35S:: <i>SCL31</i>	60
3.4.3.1 Anzahl der Seitenwurzeln von <i>sc/31</i> und 35S:: <i>SCL31</i>	60
3.4.3.2 Phyllotaxis der Überexpressionslinie 35S:: <i>SCL31</i>	61
3.4.3.3 Anzahl der Seitensprosse von <i>sc/31</i> Mutanten	61
3.4.3.4 Ermittlung des Blühzeitpunkts	62
3.4.3.5 Absolute Länge der Pflanzen	63
3.4.3.6 Phänotypische Untersuchungen der Schoten	63
3.4.3.7 Verminderte Abszission der Kronblätter	65
3.5 Mögliche additive Effekte in <i>sc/8/sc/31</i> Doppelmutanten	65
3.6 Immunologischer Nachweis der Überexpressionslinien	66
3.6.1 Herstellung eines SCL8 Anti-Serums	66
3.6.2 Immunoassay-Analysen mit Hilfe des SCL8 Anti-Serum	66
3.6.3 Immunoassay-Analysen mit GFP Anti-Serum	67
3.7 Lokalisierung der SCL Proteine in der Zelle	67
3.7.1 Eingrenzung des Kernlokalisierungssignals in <i>SCL8</i>	68
3.8 Biochemische Analyse der GRAS-Protein Domänen	71
3.8.1 Homologe und heterologe Interaktion von SCL8, 23 und 31	71
3.8.2 <i>In vivo</i> Transaktivierung	76
3.8.3. Eingrenzung der transaktivierenden Domäne von <i>SCL8</i>	76
4 Diskussion	80
4.1 Charakterisierung der Proteine SCL8, 23 und 31	80
4.1.1 Phänotyp der <i>sc/8</i> Mutante und der Überexpressionslinie 35S:: <i>SCL8</i>	80
4.1.1.1 Expression von <i>SCL8</i> und Auxinakkumulation	85
4.1.2 Phänotyp der Mutante <i>sc/31</i> und der Überexpressionslinie 35S:: <i>SCL31</i>	86
4.1.3 Mögliche additive Effekte von SCL8 und SCL31	88
4.1.4 Bedeutung von Auxin und ABA für SCL8 und SCL31	89

4.1.5 Phänotyp der <i>sc/23</i> Mutante und der Überexpressionslinie <i>35S::SCL23</i>	92
4.2 Proteinstruktur und evolutionärer Ursprung der GRAS-Proteine	93
4.3 Lokalisierung der GRAS-Proteine	94
4.4 GRAS-Proteine als mögliche Transkriptionsfaktoren	95
5 Material	96
5.1 Materialien	96
5.1.1 Pflanzenmaterial	96
5.1.2 Computerprogramme	96
5.1.3 cDNS-Bibliothek	96
5.1.4 Hormone	96
5.1.5 Pestizide und Hormonblocker	97
5.1.6 Enzyme und fertige Pufferlösungen	97
5.1.7 Antikörper	97
5.1.8 Antibiotika	97
5.1.9 Kompetente Zellen	98
5.1.10 Vektoren	98
5.1.11 "Kits"	98
5.1.12 Oligonukleotide	98
5.1.13 Verwendete Chemikalien	100
5.1.14 Filter, Membranen und sonstige Materialien	102
6 Methoden	103
6.1 Pflanzenanzucht und Pflanzenhaltung	103
6.1.1 Pflanzenmaterial	103
6.1.2 Kreuzungen	103
6.1.3 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	103
6.1.4 Aussaat transformierter Samen	104
6.1.5 Oberflächensterilisation und Ausbringen der Samen	104
6.1.6 Selektion homozygoter Mutanten <i>sc/8</i> , <i>23</i> und <i>31</i>	105
6.2 Physiologische Charakterisierung	105
6.2.1 Ermittlung der Keimungseffizienz	105
6.2.2 Ermittlung der Anzahl wachstumsdefizienter Keimlinge	105

6.2.3 Bestimmung der Wurzellänge	106
6.2.4 Bestimmung der Anzahl der Seitenwurzeln	106
6.2.5 Hypokotylllänge auf Ethylen	106
6.2.6 Ermittlung des Blühzeitpunkts	106
6.2.7 Physiologische Analyse adulter Pflanzen	107
6.2.8 Herstellung NAA-haltiger Paste	107
6.2.9 Kallusinduktion aus Wurzel- und Hypokotylfragmenten	108
6.3 Molekularbiologische Methoden zur Analyse von DNS	108
6.3.1 Extraktion genomischer DNS (CTAB)	108
6.3.2 Extraktion genomischer DNS (SDS-Schnellmethode)	108
6.3.3 Amplifikation der Scarecrow-like Gene <i>SCL 8, 23 und 31</i>	109
6.3.4 Fällung der DNS für Klonierung und Sequenzierung	109
6.3.5 Die Gateway [®] Technologie	110
6.3.6 Klonierung in den pENTR/D-TOPO [®] Eingangsvektor	110
6.3.7 Klonierung in den Gateway-Destinationsvektor	111
6.3.8 Herstellung kompetenter Zellen aus <i>E. coli</i>	112
6.3.9 Transformation in den pENTR-Vektor und den Destinations-Vektor	112
6.3.10 Transformation in <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	113
6.3.11 Plasmidpräparation im Mini-Maßstab	113
6.3.12 Plasmidpräparation im Midi-Maßstab	113
6.3.13 Überprüfung der Klone durch PCR	114
6.3.14 Überprüfung der Klone durch Restriktion von Plasmiden	114
6.3.15 Überprüfung der Klone durch Sequenzierung	114
6.4. Molekularbiologische Methoden zur Analyse von RNS	114
6.4.1 Extraktion von RNS	114
6.4.2 DNase I Verdau	115
6.4.3 Photometrische Bestimmung der Konzentration von RNS und DNS	115
6.4.4 Reverse Transkriptase-PCR	115
6.4.5 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese	116
6.5 Biochemische Methoden zur Analyse von Proteinen	116
6.5.1 Isolierung von Proteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	116

6.5.2 SDS-Gelelektrophorese	116
6.5.3 Bestimmung des Proteingehalts eines Extrakts	117
6.5.4 Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membran	117
6.6 Das ProQuest™ Hefe-Zwei-Hybrid-System	118
6.6.1 Induktion der Kompetenz von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120
6.6.2 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120
6.6.3 Plasmidpräparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	121
6.6.4 Der 3-AT-Test	121
6.6.5 Der X-Gal-Test	122
6.6.6 Der CPRG-Test	123
6.6.7 Das Ein-Hybrid-System	124
6.7 Histologische Methoden	124
6.7.1 GFP- und GFP-GUS-Fusionen mit <i>SCL8</i> , 23 und 31	124
6.7.2 Präzipitation des Plasmidvektors an Goldpartikel	125
6.7.3 Ballistischer Transfer beladener Goldpartikel in Pflanzenmaterial	125
6.7.4 Fluoreszenzmikroskopie	126
6.7.5 Histochemische GUS-Analysen	126
6.7.6 Anfertigung histochemischer Schnitte	126
6.7.7 Ein-Hybrid Analyse in Zwiebelepidermiszellen	127
6.7.8 Histochemischer Nachweis von NAN- und GUS-Aktivität	127
6.8 Sequenzanalyse	127
6.9 Datenbanken	127
Abkürzungsverzeichnis	128
Literaturverzeichnis	132
Danksagung	133

1 Zusammenfassung

GRAS-Proteine stellen eine große Proteinfamilie dar, die ausschließlich in Pflanzen zu finden ist, was darauf hinweist, dass die Proteine pflanzenspezifische Aufgaben übernehmen. Das Verständnis der biologischen Funktion der GRAS-Proteine während der Pflanzenentwicklung steht noch am Anfang. Die bisherigen Erkenntnisse lassen jedoch schon erkennen, welche wichtigen und umfangreichen Aufgaben diese Proteinfamilie zu erfüllen hat. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Gene „SCARECROW-LIKE“ (=SCL) 8, 23 und 31. Dafür wurden zu Beginn *Arabidopsis thaliana* Insertionslinien isoliert, die im regulatorischen Bereich vor dem Gen oder innerhalb des kodierenden Bereichs der Gene *SCL8*, 23 und 31 eine T-DNS bzw. ein Transposon enthielten. Homozygote Linien wurden durch Segregation mittels PCR-Nachweis bezüglich der Insertion auf beiden Chromatiden identifiziert.

Rosettenpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* entwickeln aus ihrer vegetativen grundständigen Rosette eine Infloreszens. Für eine formelle Beschreibung der Architektur einer Pflanze ist es notwendig, den Aufbau und die Organisation von Pflanzen zu erklären. Pflanzen sind modular aufgebaut. Das als Phytomer bezeichnete „Modul“ ist ein Bestandteil des Sprosses, welches sich mehrfach wiederholt. Es besteht aus einem Nodium (=Blattansatz), einer Internode, einem Blatt und einer in dessen Achsel entwickelten Seitenknospe. Die Entwicklung neuer Seitentriebe erfolgt aus den Lateralmeristemen in den Achseln der Blätter. Die Isolation von Mutanten mit veränderter Architektur ist ein vielversprechender Ansatz um Einblicke in die Signalwege der Pflanzenentwicklung zu erlangen.

Die Mutante *sc/8* entwickelte Rosetten in den Achseln von Kaulinblättern, was einer Rückkehr in die vegetative Phase entspricht, obwohl die Pflanze bereits die reproduktive Phase erreicht hatte. Neben diesen Hochrosetten konnte auch eine partiell dekussierte Blattstellung anstelle der spiraligen Anordnung, einen verspäteten Blühzeitpunkt, eine verlängerte Primärwurzel, mehr Seitenwurzeln sowie wachstumsarretierte Keimlinge, deren Meristem im Vergleich zum Wildtyp augenscheinlich verkleinert war. Die Pflanzen der Überexpressionslinien entwickelten zu 25 % kleine, infertile Schoten.

Die Mutante *sc/31* zeigte betreffend der Pflanzenarchitektur einen, der Linie 35S::*SCL8* ähnlichen Phänotyp. In der Mutante *sc/31* sowie in den Überexpressionslinien 35S::*SCL8* und 35S::*SCL31* entwickelten sich in den Achseln der Kaulinblätter zusätzliche Seitentriebe. Zudem war der Abstand und die Zahl der Schoten verändert. Die Ergebnisse zeigten, dass der Verlust von *SCL8* bzw. *SCL31* jeweils zu einem pleiotropen Phänotyp führte. Mit Hilfe von Reportergenkonstruktionen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *SCL8* und *SCL31* vor allem in Geweben und Organen stattfindet, die entwicklungsrelevant sind und in denen auch das Pflanzenhormon Auxin seinen Wirkungsort hat.

Untersuchungen dieser Arbeit haben erste Anhaltspunkte dafür erbracht, dass möglicherweise noch ein weiteres Pflanzenhormon, die Abscissinsäure (=ABA), im Gleichgewicht mit Auxin, an diesen Prozessen beteiligt ist.

Die Mutante *sc/23* sowie die korrespondierende Überexpressionslinie *35S::SCL23* wurde bezüglich ihrer Reizantwort auf 1-Aminocyclopropan-1-Carboxyl Säure (=ACC), Ethylen und Glucose physiologisch untersucht. Hierzu konnten nur schwache Phänotypen nachgewiesen werden. Die Überexpressionslinie war in der Lage noch auf hohen Paclobutrazol (=PAC) Konzentrationen zu keimen. Die Expression von *SCL23* war nur in oberirdischen Pflanzenteilen bis zum 15. Tag nachweisbar.

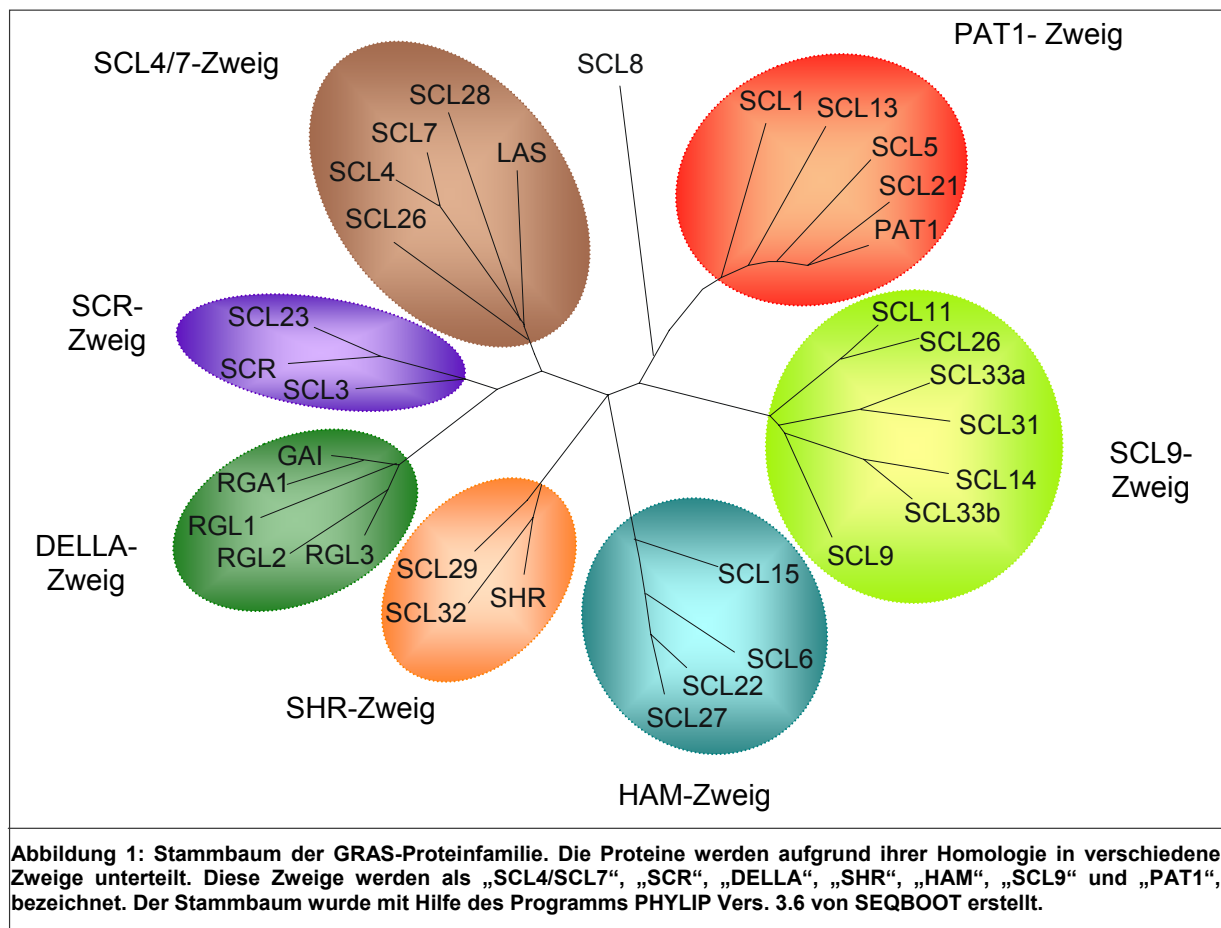
Aus zellbiologischen und biochemischen Untersuchungen ging hervor, dass die Proteine *SCL8*, *SCL23* und *SCL31* im Zellkern lokalisiert sind. Hinsichtlich *SCL8* und *SCL31* konnte auch gezeigt werden, dass beide Proteine transaktivierende Eigenschaften besitzen. Die Transaktivität, sowie die Kern-Lokalisierungssequenz von *SCL8* und *SCL31* liegen vermutlich im N-Terminus begründet. Das Protein *SCL23* hingegen ist nicht transaktivierend. Der Vergleich der Proteinsequenzen von *SCL8*, *SCL23* und *SCL31* zeigte, dass in *SCL23* der N-Terminus stark verkürzt war. Das kann als Hinweis gewertet werden, dass der N-Terminus eine wichtige Rolle in der Aufgabenerfüllung der GRAS-Proteine übernimmt. Die Kernlokalisierung ist Voraussetzung für Proteine die an der Transkription beteiligt sind.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist anzunehmen, dass die Proteine *SCL8* und *SCL31* einen Schalter in der Meristementwicklung und –initiation darstellen, der es den Pflanzen erlaubt, die zeitliche Abfolge der Organentwicklung zu regulieren. Gerade für die Entwicklung, der Knospen und der Wurzeln wurde bereits gezeigt, dass Auxine eine wichtige Aufgabe in der Regulation der Meristementwicklung übernehmen. Das in den letzten Jahrzehnten erzielte Wissen bezüglich der Phytohormone ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Entschlüsselung pflanzlicher Entwicklung und deren Regulation. Diese interessante Proteinfamilie wird noch viele Antworten auf dringende Fragen der Entwicklungsbiologie von Pflanzen geben können.

2 Einleitung

2.1 Die GRAS-Protein Familie

GRAS-Proteine stellen eine Familie von pflanzenspezifischen Proteinen dar, die Ende der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts in *Arabidopsis thaliana* entdeckt wurden und hauptsächlich in höheren Pflanzen zu finden sind. Der „niedrigste“ in dieser Hinsicht bekannte Organismus ist das Moos *Physcomitrella* (Nishiyama et al. 2003). Der Name dieser Proteinfamilie leitete sich von den ersten drei Vertretern ab die identifiziert wurden, GA INSENSITIVE (=GAI), Repressor of GA (=RGA) und SCARECROW (=SCR) (DiLaurenzio et al. 1996, Peng et al. 1997, Silverstone et al. 1998). Die Familie der GRAS-Proteine in *Arabidopsis thaliana* besteht aus 33 Mitgliedern und scheint in verschiedene Ebenen der Signaltransduktion und Entwicklung von Pflanzen involviert zu sein (Bolle 2004).



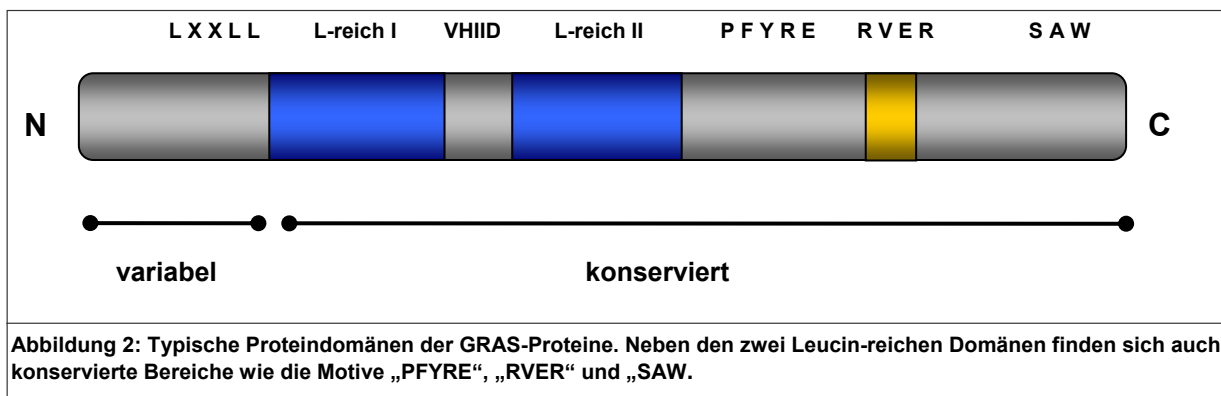
Das erste identifizierte Protein, SCR reguliert die asymmetrische Zellteilung während der Wurzelentwicklung (Richards et al. 2000). Die Mitglieder der GRAS-Proteinfamilie werden phylogenetisch in acht große Unterfamilien eingeteilt. Diese Zweige werden als „SCL4/SCL7“, „SCR“, „DELLA“, SHORT ROOT (=„SHR“), HAIRY MERISTEM (=„HAM“), „SCL9“ und PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION (=„PAT1“), bezeichnet (Abb. 1).

Das Protein SCL8 konnte aufgrund geringerer Homologie seiner Domäne keiner der Unterfamilien zugeordnet werden (Abb. 1).

2.1.1 Strukturelle Merkmale der GRAS-Proteine

GRAS-Proteine sind in der Regel 400 - 770 Aminosäuren lang (Abb. 2). Der N-Terminus der einzelnen GRAS-Proteine ist sehr variabel. Einige dieser Familienmitglieder weisen sich durch einen größtenteils homopolymeren N-Terminus aus. Diese Sequenz bestehen unter anderem aus mehreren aneinander gereihten Prolin-, Glutamin-, Threonin-, Serin-, Glycin- oder Aspartat-Resten besteht. Das deutet auf eine Interaktion mit RNS-Polymerasen hin, da sich solche Sequenzabfolgen in der Regel bei Transkriptionsfaktoren finden (Clakhoven et al. 1996, Liu et al. 1999).

Der C-Terminus hingegen, ist weitgehend konserviert. Er enthält die für GRAS-Proteine charakteristischen Leucin-reichen Regionen, die eine VHIID Domäne (benannt nach den konservierten Aminosäureresten) flankieren (Abb. 2). Jede der beiden Leucin-Domänen besteht aus etwa 100 Aminosäuren. Die Anhäufung der Leucin-Reste der GRAS-Proteine ähnelt den sogenannten „Leucin-Zippern“, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren.



Trotzdem könnten die konservierten Leucinreste der GRAS-Proteine für Protein-Protein-Interaktionen genutzt werden. Einige GRAS-Proteine enthalten ein LXXLL Motiv. Über diese Domäne sind in Säugerzellen Ko-Aktivatoren in der Lage an nukleäre Steroidhormon-Rezeptoren zu binden (Heery et al.1997). Weitere Domänen des konservierten Bereichs sind die Motive „PFYRE“, „RVER“ und „SAW“, deren jeweilige Bezeichnung sich von der Konsensussequenz der entsprechenden Aminosäuren ableitet (Abb. 2) (Pysh et al. 1999). Das „PFYRE“-Motiv der GRAS-Proteine besitzt einen phosphorylierbaren Tyrosin-Rest, und ähnelt damit der SH2-Domäne der Signal-Transkriptionsaktivatoren (=STAT).

Aufgrund der Struktur und Lage der SH2-Domänen gibt es eine Homologie zwischen den GRAS- und den STAT-Proteinen (Richards et al. 2000). Diese Domäne findet sich vor allem in Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen. STAT-Proteine sind wichtige Komponenten der Signaltransduktion in tierischen Zellen. Sie konnten inzwischen in verschiedenen

eukaryotischen Modellsystemen wie bei *Drosophila*, *Anopheles*, *Dictyostelium* und *Saccharomyces* gefunden werden (Gao et al. 2004). Die DNS-Bindedomäne in STAT-Proteinen ist von Leucin-Heptameren flankiert und erinnert somit an die von zwei Leucinreichen Regionen flankierte VHLID-Domäne der GRAS-Proteine (Schumacher et al. 1999).

Sequenzanalysen ergaben, dass einige GRAS-Proteine Kernlokalisierungssequenzen (=NLS) besitzen (Raikhel et al. 1992, DiLaurenzio et al. 1996, Peng et al. 1997, Silverstone et al. 1998) was ein Hinweis darauf sein könnte, dass es sich hierbei um Transkriptionsfaktoren handeln könnte. Die Proteine *SCL8*, 23 und 31 sind ebenfalls im Kern lokalisiert (Abschnitt 3.7), was eine Voraussetzung dafür ist, dass Proteine überhaupt als Transkriptionsfaktoren in Betracht gezogen werden können. Desweiteren finden sich kurze homopolymere Abschnitte von Serin- und Threonin Resten in den N-Termini von GRAS-Proteinen, wie man sie aus den Sequenzen anderer Transkriptionsfaktoren kennt. Bisher konnte diese Hypothese, dass es sich bei den GRAS-Proteinen um Transkriptionsfaktoren handelt jedoch noch nicht bewiesen werden.

2.1.2 Bisherige Kenntnisse über GRAS-Proteine

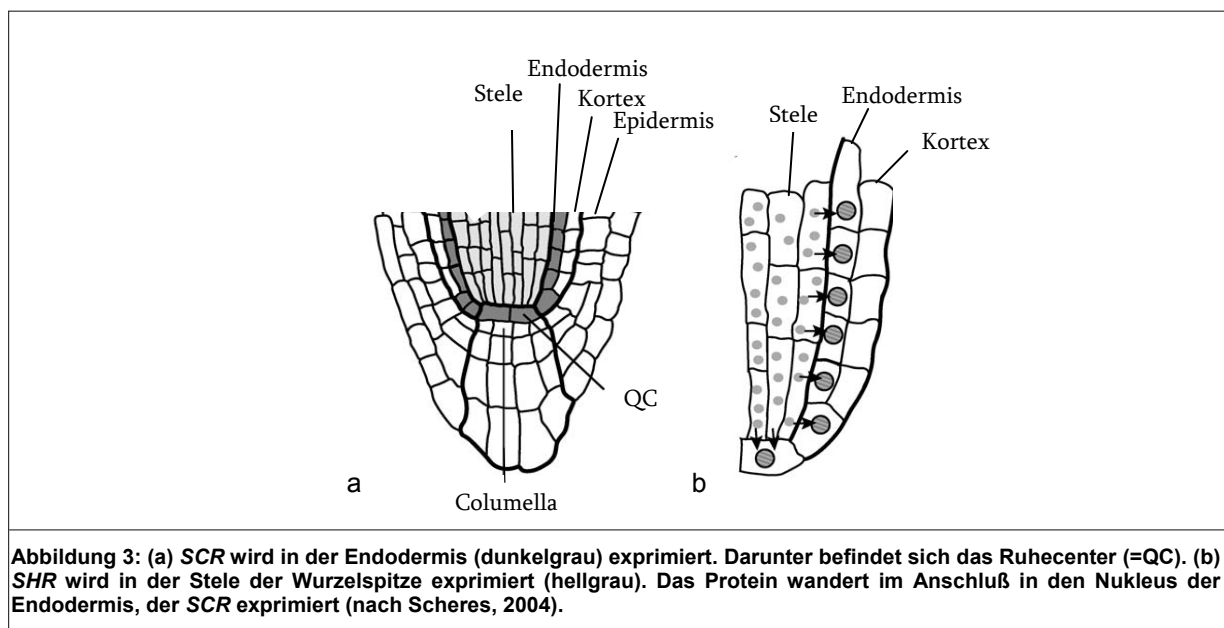
Über die biologische Funktion der GRAS-Proteine ist noch wenig bekannt. Studien deuten darauf hin, dass es sich um regulatorische Komponenten handelt, die in viele zelluläre Prozesse, wie Meristembildung, Wurzelentwicklung und in hormonelle Signaltransduktion involviert sind (Bolle 2004). Im Laufe der Studien bezüglich der GRAS-Proteine stellte sich heraus, dass die in Untergruppen zusammengefassten Proteine in der Regel auch dem gleichen Signaltransduktionsweg angehören. Beispielsweise sind die Proteine „GAI“, „RGA“, „RGA-LIKE“1, 2 und 3 (=RGL1, 2 und 3), des „DELLA“-Zweiges am Signalweg der Gibberellinsäure beteiligt (Peng et al. 1997 und 1999).

Die *scr* Mutante zeichnet sich phänotypisch dadurch aus, dass ihre Endodermis und ihr Kortex zu einer Hybridzellschicht „verschmolzen“ sind, mit Merkmalen beider Zelltypen (Benfey et al. 1993, van den Berg et al. 1995). SCR ist vermutlich in die asymmetrische Zellteilung der Initialzellen involviert, die zur Bildung von Kortex und Endodermis führt. Dieses Protein ist essentiell für Zellteilung und die Separation der Zellschichten Endodermis und Kortex (van den Berg et al. 1995, DiLaurenzio et al. 1997).

Es wird im Ruhezentrum (Quiescent Centers (=QC)) der Wurzel exprimiert und ist für den Erhalt des omnipotenten Stammzellstatus mitverantwortlich. Die Zellen des Ruhezentrums sind eine kleine Anzahl von Zellen in der Wurzelspitze. Sie sind die Stammzellpopulation im Wurzelmeristem (van den Berg et al. 1997). Untersuchungen zeigten, dass *SCR* auch in oberirdischen Regionen der Pflanze, in der L1-Schicht des Sprossmeristems und in den

Bündelscheitelzellen exprimiert wird (Sabatini et al. 2003). Das Hypokotyl der Mutante *scr* ist nicht in der Lage, Schwerkraft als Signal wahrzunehmen (Fukaki et al. 1998, Wysocka-Diller et al. 2000). Im Vergleich zum Wildtyp verfügt diese Mutante über keine funktionsfähige amyloplastenhaltige Zellschicht, die es der Pflanze ermöglicht, Schwerkraft als Reiz wahrzunehmen.

Das GRAS-Protein SHR ist ebenfalls in die Wurzelentwicklung involviert (Helariutta et al. 2000). Sowohl bei der *scr* als auch bei der *shr* Mutante wird nur eine Zellschicht des Grundgewebes entwickelt, jedoch zeigt diese „Hybridschicht“ in *shr* Mutanten nur Eigenschaften des Kortex und nicht der Endodermis. Das SHR Protein spielt eine Rolle bei der Zellteilung und der Spezifizierung der Endodermis (Helariutta et al. 2000). Dieses Protein wird zunächst in der Stele synthetisiert und wandert dann durch die Plasmodesmen in die Zellkerne der Endodermiszellen. SHR induziert dort unter anderem die Transkription von *SCR* (Nakajima et al. 2001, Gallagher et al. 2004). Das SCR Protein reguliert die „Wanderung“ von SHR in die Endodermis (Heidstra et al. 2004, Sena et al. 2004) (Abb. 3) und determiniert innerhalb des Ruhezentrums der Wurzel, die Identität der Stammzellen (Wysocka-Diller et al. 2000).



Das GRAS-Protein LAS/SCL18 aus dem LS-Zweig (Abb. 1) spielt in der Anlage der lateralen Sprossorgane eine wichtige Rolle (Greb et al. 2003). In GUS-Experimenten wurde die Expression von LAS/SCL18 in den Blattachsen nachgewiesen. Durch Studien konnte gezeigt werden, dass dieses Protein für die korrekte Expression der Homöobox-Gene SHOOTMERISTEMLESS (=STM) und REVOLUTA (=REV) verantwortlich ist. Die Proteine LS sowie MONOCULM1 (=MOC1) sind die orthologen Proteine aus Tomate und Reis und ebenfalls an der Verzweigung bzw. der Entwicklung von Seitentrieben beteiligt (Schumacher

et al. 1996, Li et al. 2003). Auch das aus der Petunie isolierte GRAS-Protein HAM ist an der Expression von *STM* beteiligt (Stuurman et al. 2002). In *ham* Mutanten kann der Stammzellstatus des apikalen Sprossmeristems nicht aufrechterhalten werden. Die Zellen differenzieren zu Epidermalzellen mit Trichomen aus, wodurch die Mutante den Namen *ham* erhielt. Die Tatsache, dass beide Proteine das gleiche Gen regulieren, lässt vermuten, dass sie in den gleichen Signaltransduktionsweg der Meristementwicklung involviert sind (Lenhard et al. 2002).

Die GRAS-Proteine der PAT1-Untergruppe (Abb. 1) sind an der Phytochrom-Signaltransduktion beteiligt (Bolle et al. 2000, Torres-Galea et al. 2006). Das GRAS-Protein SCL8 zweigt phylogenetisch nahe dem PAT1-Zweig ab (Abb. 2). Es gibt allerdings keinerlei Hinweise darauf, dass SCL8 mit der Phytochrom-Signaltransduktion in Verbindung gebracht werden könnte. Das Protein SCL31 ist der Unterfamilie „SCL9“ zugeordnet. Bisher wurde noch keines der Proteine aus diesem Zweig näher charakterisiert.

Die Untergruppe der DELLA-Proteine innerhalb der GRAS-Protein-Familie (Abb.1) ist in den Gibberellinsäure-Signaltransduktionsweg involviert (Peng et al. 1997, Silverstone et al. 1998, Lee et al. 2002, Wen et al. 2002). Diese Proteine sind aufgrund ihrer charakteristischen Domäne innerhalb des N-Terminus in der Familie der DELLA Proteine zusammengeführt. Innerhalb dieses Zweiges finden sich GAI, RGA, RGL1, RGL2 und RGL3 (Abb. 1). Die DELLA-Proteine werden aufgrund eines GA-Signals phosphoryliert. Diese Phosphorylierung dient als positives Signal für die SCF^{GID2}E3 Ligase, was dazu führt, dass durch anschließende Polyubiquitinierung die Degradation der DELLA Proteine eingeleitet wird (Itoh et al. 2005).

2.2 Phytohormone und Signaltransduktion

Pflanzen sind in der Regel ortsgebundene Organismen und müssen daher flexibel auf ihre Umwelt reagieren. Einflüsse wie Licht, Wasser, Nährstoffe, Pathogene oder Berührung wirken ständig auf die Pflanze ein. Pflanzen reagieren auf Veränderungen ihrer Umwelt durch Anpassung ihrer Physiologie. Pflanzenhormone sind wesentlich an der Steuerung der Entwicklung und der Adaption an Umweltbedingungen beteiligt.

Endogene und exogene Signale werden in der Regel durch Pflanzenhormone integriert. Es sind natürlich vorkommende organische Substanzen, die physiologische Prozesse bereits in niedrigen Konzentrationen beeinflussen (Kende et al. 1997). Neben den fünf klassischen Pflanzenhormonen Abscissinsäure, Auxin, Cytokinin, Ethylen und Gibberellinsäure werden noch eine Reihe weiterer Verbindungen als Pflanzenhormone diskutiert.

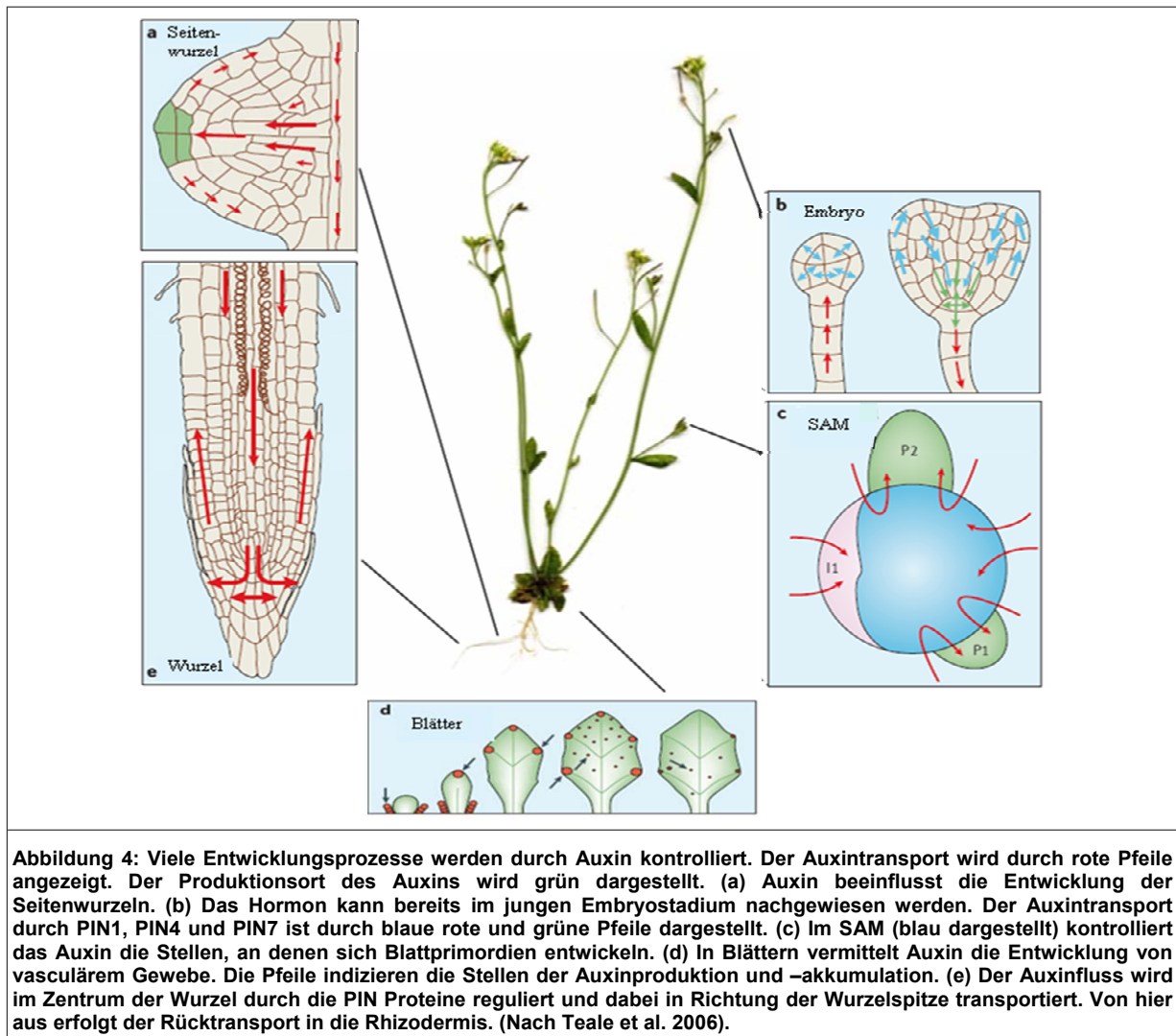
2.2.1 Auxin

Beim Auxin handelt es sich um das am besten untersuchte Pflanzenhormon. Chemisch gesehen handelt es sich um Indol-3-Essigsäure (=IES) oder dessen Derivate, die alle von der Aminosäure Tryptophan abgeleitet sind (Lyser et al. 2006). IES ist der wichtigste Vertreter der Auxine in höheren Pflanzen. Das erste entdeckte pflanzliche Hormon Auxin spielt eine zentrale Rolle sowohl in der Zellteilung als auch in Wachstums- und Differenzierungsprozessen der Pflanzen. Auxine beeinflussen nahezu jeden Aspekt der Pflanzenentwicklung (Evans et al. 1984, Hobbie et al. 1994) (Abb. 4). Das Auswachsen von Seitentrieben wird in Pflanzen durch Auxin inhibiert, was zur apikalen Dominanz führt. Auxinreduzierte Pflanzen sind in der Regel stark verzweigt. Mutanten mit erhöhter Auxinkonzentration zeigen eine verminderte Anzahl an Seitentrieben (Romano et al. 1993). Auxine nehmen auch Einfluss auf die Transkription einiger Gene die mit Seneszenz und/oder Abszission korreliert sind (Hong et al. 2000, Tucker et al. 2002). Mutanten mit Defekten in der Auxin-Synthese, dem Transport oder der Signalweiterleitung, zeigen Effekte in der Organentwicklung, deren Position und Anzahl. Diese Effekte indizieren die wichtige Rolle des Auxins in Organformation und Phyllotaxis (Okada et al. 1991, Reinhardt et al. 2000).

Ebenso spielt Auxin in der Embryogenese eine entscheidende Rolle (Abb. 4b). Mittels eines IAA-Gradienten wird der Embryo polarisiert. Daraus entstehen ein apikaler und ein basaler Pol (Schiavone et al. 1997, Hadfi et al. 1998, Geldner et al. 2005). Die Inhibierung des polaren Auxintransports behindert die Ausbildung des SHOOT APICAL MERISTEM (=SAM) und ROOT APICAL MERISTEM (=RAM) (Liu et al. 1993). Dann entwickeln sich Pflanzen, die in ihrem Wachstum arretiert sind. Zwei Mutanten, deren polarer Auxin-Transport gestört ist, sind *monpteros* (=mp) und *bodenlos* (=bdl) (Przemeck et al. 1996, Hamann et al. 1999). Die Fehlentwicklung der *mp* Mutante beginnt schon während des Acht-Zell-Stadiums (Berleth et al. 1993, Hadfi et al. 1998). Die Auxin-Mutante *bdl* entwickelt kein primäres Wurzelmeristem und weicht bereits im embryonalen Zwei-Zell-Stadium von einer normalen Entwicklung ab. In diesem Stadium teilt sich die apikale Tochterzelle der *bdl* Zygote nicht vertikal, wie der Wildtyp sondern horizontal. Das embryonale Zellmuster ist dadurch so stark gestört, dass diese Mutante weder Wurzel noch Hypokotyl entwickelt (Hamann et al. 1999).

Der Transport dieses Hormons wird durch eine Familie von Efflux-Transportern, den PIN-FORMED (=PIN) Proteinen vollzogen (Gälweiler et al. 1998) (Abb. 4). PIN1 ist in der basalen Membran epidermal-kortikaler Zellen lokalisiert (Friml et al. 2003). Auxin induziert die Transkription von *PIN* auf direktem Weg (Wisniewska et al. 2006) (Abb. 4). Mit dem TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE PROTEIN1 (=TIR1) wurde im Jahre 2005 der erste Auxinrezeptor isoliert (Dharmasiri et al. 2005, Kepinski et al. 2005). Dieser Rezeptor

vermittelt die auxinabhängige Transkription. Auxin unterstützt dabei die Assemblierung des SCF^{TIR1}-Aux/IAA Komplexes (Woodward et al. 2005). Mitglieder der AUX/IAA-Proteinfamilie sind kurzlebige Repressoren von Transkriptionsfaktoren, die die Expression auxininduzierter Gene verhindern und über den SCF^{TIR1}-Komplex abgebaut werden. Der SCF^{TIR1}-Komplex stellt somit einen wichtigen Kontrollpunkt bei der Auxin-Signaltransduktion dar (Dharmasiri et al. 2005, Kepinski et al. 2005).



2.2.2 Ethylen

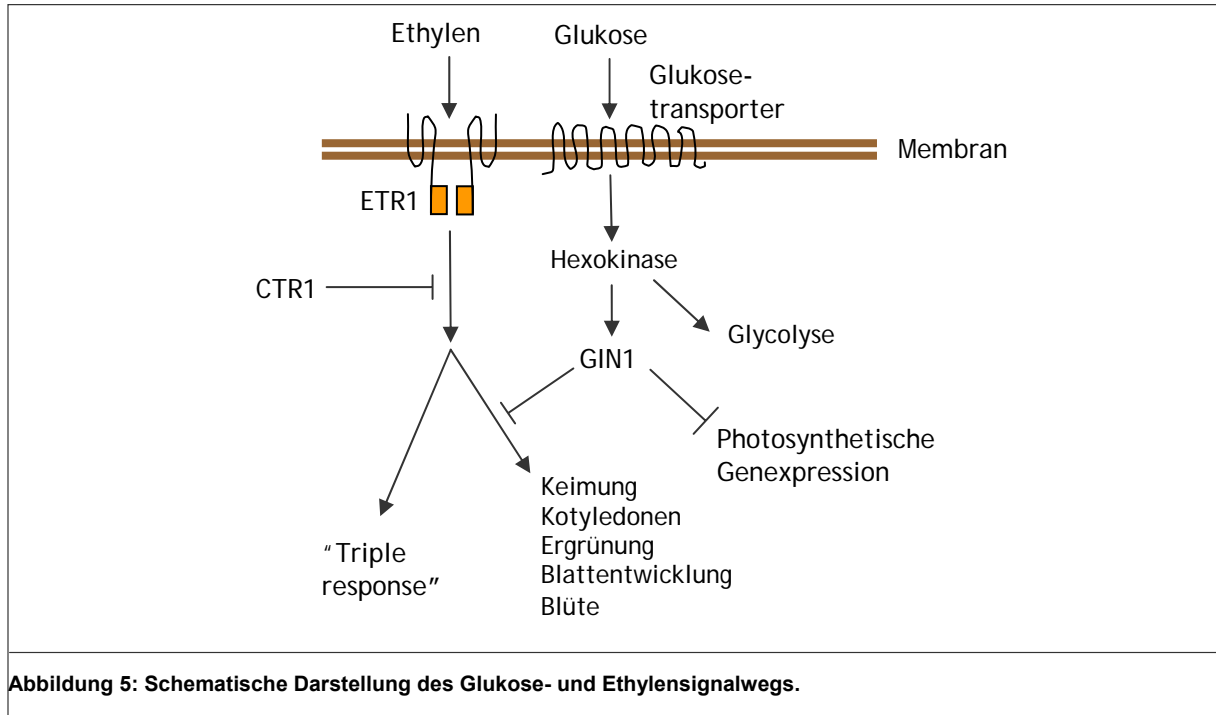
Das gasförmige Ethylen kontrolliert verschiedene Aspekte des Wachstums und der Entwicklung einer Pflanze. Hierzu zählen die Keimung, die Zellelongation, die Regulierung der Fruchtreife, die Hypokotylverlängerung sowie die Wurzelentwicklung und der Blattabwurf (=Seneszens) (Abeles et al. 1992, Cary et al. 1995). Der Wildtyp der Pflanze *Arabidopsis thaliana* reagiert auf Ethylen mit einem so genannten „Triple response“, also einer „Dreifach-Antwort“ (Ecker et al. 1987). Das Hypokotyl ist deutlich verkürzt, stark verdickt und bildet zusätzlich einen apikalen Haken aus, der das apikale Meristem des jungen Keimlings schützt (Guzmán et al. 1990). In Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass neben dem Ethylen auch das Auxin an der Ausbildung des Hypokotylhakens beteiligt ist (Abeles et al. 1992). Vermutlich führt die Ungleichverteilung des Auxins dazu, dass bei hoher Auxinkonzentration die Ethylensynthese stimuliert wird. Eine daraus resultierende hohe Ethylenkonzentration führt zu einer einseitigen Wachstumshemmung, wodurch eine Krümmung erfolgt und ein asymmetrischer apikaler Haken ausgebildet wird.

Die Ethylensignalkaskade wird in *Arabidopsis thaliana* durch fünf Mitglieder der Ethylen Rezeptorfamilie ETHYLEN RESISTENT1 (=ETR1), ETR2, ETHYLEN RESPONSE1 (=ERS1), ERS2 und ETHYLEN INSENSITIV 4 (=EIN4) vermittelt (Hua et al. 1998, Sakai et al. 1998, Bleecker et al. 2000). Die Mutante *etr1* zeigt einen spätblühenden Phänotyp, vergrößerte Samen, sowie eine erhöhte Konzentration an Auxin, Abscissinsäure (=ABA) und ABA-Derivaten (Bleecker et al. 1988). In Abwesenheit von Ethylen sind die Rezeptoren in einem signalaktiven Modus arretiert (Clark et al. 1998, Etheridge et al. 2005). Nachdem Ethylen gebunden wird, wechseln die Rezeptoren in einen signalinaktiven Status, die Ethylenrepression wird verringert und erlaubt eine reguläre Reizantwort auf Ethylen (Kieber et al. 1993, Hua et al. 1998, Gamble et al. 2002). In Versuchen an „Knock-out“ Mutanten konnte nachgewiesen werden, dass die Rezeptoren funktionell redundant sind (Hua et al. 1998).

2.2.2.1 Interaktion zwischen Ethylen und Glukose

Die Signalwege der Glukose und des Ethylens sind über die Hexokinase miteinander assoziiert (León et al. 2003) (Abb. 5). Das Protein GLUCOSE INSENSITIVE 1 (=GIN1) inhibiert die durch Ethylen aktivierte Entwicklung der Pflanzen auf der Ebene von Keimung, Blattentwicklung und Blüte (Arenas-Huertero et al. 2000) (Abb. 5). Die Charakterisierung des GIN1 Proteins zeigte, dass durch die Interaktion zwischen Ethylen und Glukose eine koordinierte Regulierung in vielen Entwicklungsphasen der Pflanzen möglich ist (Abb. 5) (Zhou et al. 1998).

Die *sugar insensitive1* (=sis1) Mutante, die allelisch zu *constitutive triple response1* (=ctr1) ist, zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass sie gegen die negativen Effekte des Herbizids Paclobutrazol (=PAC) resistent ist. Diese Fähigkeit hat die Mutante vermutlich durch eine erhöhte Konzentration an ACC einem Vorläufer des Ethylens (Gibson et al. 2001). Die *gin1* Mutante zeigt phänotypische Merkmale, die auch bei Ethylen-Überexpressionslinien zu finden sind.



2.2.3 Abscissinsäure

Dieses Phytohormon beeinflusst viele physiologische Vorgänge in Pflanzen. Nach der Entdeckung der ABA wurden zunächst seine wachstumshemmenden Eigenschaften erkannt (Tamas et al. 1991). ABA ist ein generelles Stresshormon (Robertson et al. 1994) und wird vor allem mit dem Schließen und Öffnen der Schließzellen bei Wassermangel in Verbindung gebracht. Darüber hinaus inhibiert ABA eine frühzeitige Keimung und fördert die Samendormanz (Zeevaart et al. 1988, Giraudat et al. 1995). Möglicherweise ist ABA auch in die Entwicklung von Seitensprossen involviert (Chatfield et al. 2000). Sowohl beim Austreiben der Knospen als auch beim Auskeimen der Samen sinkt die Konzentration des ABA (Himmelbach et al. 1998, Snowden et al. 2005). Bernier et al. postulierten im Jahre 1988, dass ABA die Entwicklung der Blüten in Pflanzen inhibiert. Die ABA-Biosynthese, ausgehend von der Karotinoidbiosynthese in Plastiden (Seo et al. 2002), wurde bereits in den späten siebziger Jahren identifiziert und als möglicher „second messenger“ bezüglich des Auswachsens ruhender Knospen diskutiert (Tucker et al. 1978).

Die Mutante *abscissin insensitiv1* (=abi1) ist gegenüber der keimungshemmenden Wirkung von ABA insensitiv (Koornneef et al. 1984, Finkelstein et al. 1994).

2.3 Einfluss der Meristeme auf postembryonales Wachstum

Meristeme sind für die Formation der postembryonalen Pflanzenentwicklung verantwortlich. Fragil und an der Spitze des Sprosses bzw. der Wurzel befindlich, entwickeln sich Meristeme bis zu einer Größe von 80 – 150 µm. Da Pflanzen sessile Organismen sind, müssen sie in der Lage sein aufgrund von Umwelteinflüssen ihre Organe neu zu produzieren. Die Aufrechterhaltung der meristematischen Stammzellen ist existenziell für Pflanzen. Stammzellen sind so positioniert, dass ihr Wachstum und ihre Teilung zu einem kontinuierlichen Fluss neuer Zellen an den Flanken des Sprossmeristems führen kann (Clark et al. 2001). Die Balance zwischen Stammzellenproliferation und Differenzierung muss außerordentlich präzise reguliert sein. Die Zellen des SAM und RAM bleiben auch nach der Embryogenese aktiv (Kuhlemeier et al. 2007).

2.3.1 Das SAM ändert seine Identität nach der Blühinduktion

Das primäre SAM wird im Laufe der Embryogenese an der Basis der Kotyledonen angelegt. Im Laufe der postembryonalen Entwicklung der Pflanzen bilden die Meristeme die Wachstumspole. Während der vegetativen Wachstumsphase produziert das SAM Blätter in deren Achseln Lateralmeristeme angelegt werden (Simpson et al. 1999). Voraussetzungen für den Beginn der reproduktiven Phase ist die Änderung der Identität des Sprossapikalmeristems, das am vegetativen Sprossapex von *Arabidopsis thaliana* Blattprimordien entwickelt (Araki et al. 2001). Während der Transition von der vegetativen zur reproduktiven Phase konvertiert das primäre SAM vom vegetativen Meristem zu einem Infloreszenzmeristem (Ma et al. 1998). Daraus entstehen später die Blütenorgane, die in spiraliger Form angeordnet werden (Koornneef et al. 1998).

2.3.2 Einfluss des RAM auf die Wurzelentwicklung

Neben dem Sprossmeristem besitzt ein Keimling auch ein Wurzelmeristem. Das Wurzelmeristem unterscheidet sich vom Sprossmeristem durch seinen Aufbau, seine Funktionsweise und der daran beteiligten regulatorischen Gene. Eine zentrale Rolle spielt das QC (Abb. 3). Diese Zellen sind von Stammzellen umgeben. Jede Stammzelle teilt sich asymmetrisch, wobei eine Tochterzelle entsteht, die in Kontakt mit dem Ruhezentrum bleibt. Die andere Zelle differenziert sich aus (Scheres et al. 2002). Das Meristem der Hauptwurzel wird bereits während der Embryogenese entwickelt (Dolan et al. 1993). Die Entwicklung der Seitenwurzelmeristeme erfolgt postembryonal (de Smet et al. 2002).

2.3.3 Entwicklung von Seitenwurzeln

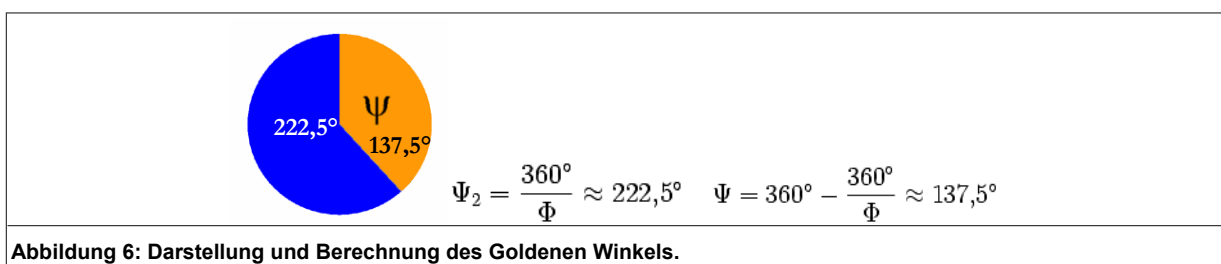
Pflanzen entwickeln ein ausgedehntes und stark verzweigtes Wurzelsystem, bestehend aus einer Hauptwurzel und den abzweigenden Seitenwurzeln. Verschiedene Signalwege sowie abiotische Stimuli entscheiden über die Wurzelarchitektur der Pflanze (Malamy et al. 2005). Die lateralen Wurzeln entstehen in einer spezifisch differenzierten Zellschicht der vaskulären Stele, auch Perizykel genannt. Die Seitenwurzelentwicklung beginnt damit, dass die Perizykelzellen in den Zellzyklus eintreten, sich teilen und als laterales Wurzelmeristem etablieren (Laskowski et al. 1995, Benfey et al. 1997). Auxin spielt dabei eine Schlüsselrolle (Torrey et al. 1954). In *Arabidopsis thaliana* und einigen anderen Spezies kann exogen appliziertes Auxin die Seitenwurzelformation an nahezu jeder möglichen Stelle initiieren (Laskowski et al. 1995).

2.4 Architektur der Pflanzen

Die Architektur der Pflanzen zeigt einen modularen Aufbau. Die sogenannten Phytomere bestehen aus Blatt, Achselknospe und einem Abschnitt des Sprosses zwischen zwei Blättern, dem sogenannten Internodium (Steeves et al. 1989). Diese Module wiederholen sich. Die Blätter der einzelnen Module stehen in genau definierten Winkeln zueinander und werden spiralg entlang des Stängels angeordnet.

2.4.1 Phyllotaxis der Pflanzen

Phyllotaxis beschreibt die Anordnung von Blättern und Blüten der Pflanzen. Die Organe von *Arabidopsis thaliana* stehen in der Regel spiralg in einem Winkel von $137,5^\circ$ zueinander. Bei Pflanzen mit dieser Blattstellung teilt der Winkel zwischen zwei aufeinander folgenden Blättern den Vollkreis von 360° im Verhältnis des Goldenen Schnittes (Kuhlemeier et al. 2007). Die Anordnung folgt dem Goldenen Winkel (Ψ), den man erhält, indem der Vollwinkel durch das Verhältnis des Goldenen Schnittes (Φ) geteilt wird (Jean et al. 1990). Der Goldene Schnitt ist das definierte Verhältnis zweier Zahlen und beträgt etwa $1:1,618$ (Φ). Subtrahiert man Ψ vom Vollwinkel, ergibt sich ein Winkel von $137,5^\circ$ Grad (Abb. 6). Vermutlich kann durch den Divergenzwinkel von $137,5^\circ$ Grad das Sonnenlicht von den Blättern optimal genutzt werden. Der Auxingradient spielt wohl eine wichtige Rolle bei der Anlage der Blattprimordien. Dabei stellt sich ein bestimmter Winkel zum vorangegangenen Blatt ein (Reinhardt et al. 2000, Kuhlemeier et al. 2007).



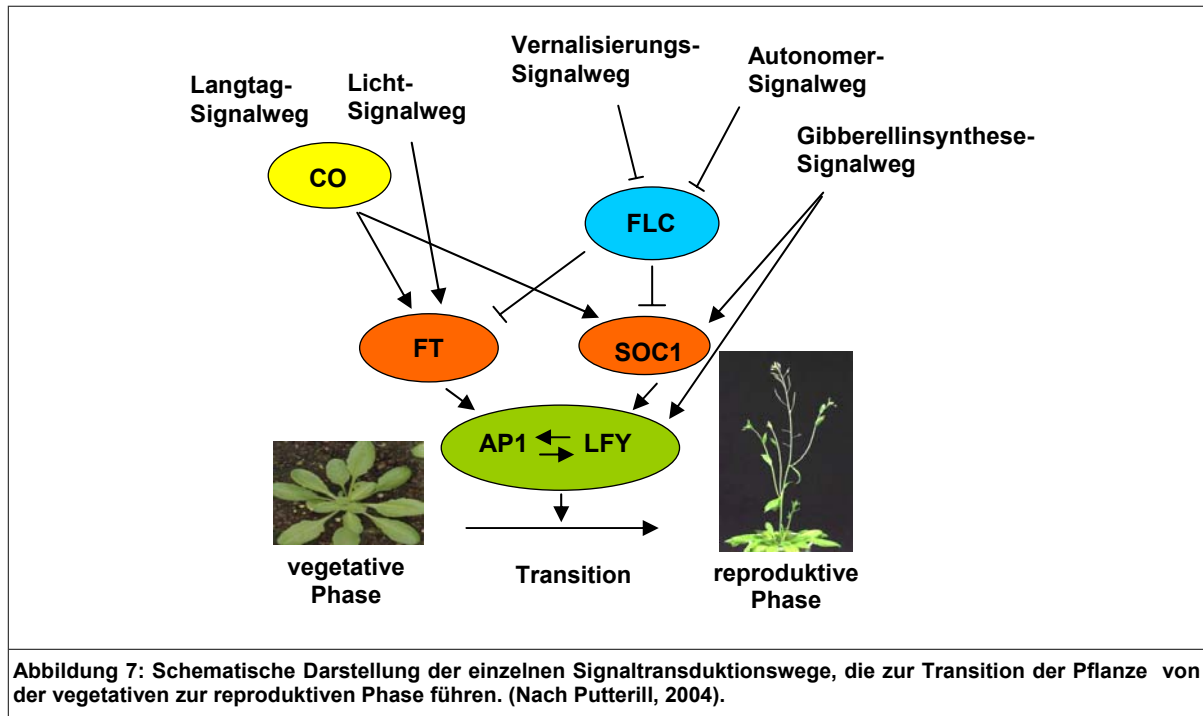
2.4.2 Transition und Blühinduktion bei *Arabidopsis thaliana*

Höhere Pflanzen durchlaufen während ihrer postembryonalen Entwicklung eine Reihe drastischer Veränderungen in verschiedenen Wachstumsphasen. Jede dieser Phasen ist charakterisiert durch die Identität der Primordien, die durch das SAM produziert werden. Eine der dramatischsten Veränderung einer Pflanze während ihres Lebenszyklus ist die Transition der Pflanzen von der vegetativen zur reproduktiven Phase. Sie ist durch ein komplexes genetisches Netzwerk reguliert, das unter anderem durch Umwelteinflüsse, wie Licht und Temperatur, beeinflusst wird. Es ist wenig bekannt über die Signale, die die Aktivität der Gene kontrolliert, die in dieser Transition involviert sind (Okamuro et al. 1993). Verschiedene Wachstumskontrollpunkte steuern die Meristeme von SAM und RAM (Laskowski et al. 1995, Benfey et al. 1997, De Smet et al. 2003). Genetische Analysen von Blühzeitmutanten haben gezeigt, dass die Regulierung dieser Signalwege zur Kontrolle der Transition durch etwa 80 Gene beeinflusst wird (Akari et al. 2001). Beim Eintritt in die reproduktive Phase wird die Entwicklung der Rosettenblätter weitgehend eingestellt und die Pflanze beginnt Seitensprosse und Blütenorgane zu entwickeln.

Die Transition wird über fünf unterschiedliche Signaltransduktionswege reguliert (Abb. 7). Hierbei handelt es sich unter anderem um den Langtag- und Lichtqualität-Signalweg, die beide durch Licht reguliert werden. Das Gen *CONSTANS* (=CO) induziert im Langtag das Protein *FLOWERING LOCUS T* (=FT1), das wiederum die Expression von die *LEAFY1* (=LFY) aktiviert (Simon et al. 1996, Nilsson et al. 1998). Während der vegetativen Phase wird LFY in den Blattprimordien exprimiert und ist durch die Lichtdauer reguliert (Bálzquez et al. 1997). Die Identität der Blütenorgane wird durch das Protein APETALA1 (=AP1) reguliert (Parcy et al. 1998) (Abb. 7). Der Transkriptionsfaktor LFY bindet an den Promotor von AP1.

Der Vernalisierungs-Signalweg wird über niedrige Temperaturen um die 0°C induziert, der die zeitliche Blühinduktion koordiniert (Koorneef et al. 1991, Lee et al. 1995). Mit dem autosomalen Signalweg reagiert die Pflanze auf endogene Veränderungen, abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstadium, in dem sich die Pflanze gerade befindet. Durch diese beiden Signalwegen wird das Protein FLOWERING LOCUS C (=FLC) inhibiert und dadurch die Blüte induziert (Michaels et al. 1999, Sheldon et al. 1999, He et al. 2003) (Abb. 7). In Anwesenheit von FLC werden FT und *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1* (=SOC1) inhibiert (Samach et al. 2000, Hepworth et al. 2002). Die Proteine FT und SOC1 aktivieren jeweils AP1 und LFY, die die Transition der Pflanzen von der vegetativen in die reproduktive Phase vollziehen (Araki et al. 2001, Moon et al. 2004) (Abb. 7). FT wird nicht im SAM sondern in den Blättern exprimiert. Für die Aktivierung von AP1 und LFY wird das FT in den Meristemzellen benötigt. Das FT Protein wandert dabei in den Sprossapex (Corbesier et al. 2006).

Mutationen im Gibberellin-Signalweg (Abb. 7) reduzieren die endogene GA₃-Konzentration der Pflanze stark und führen zu einer reduzierten *LFY*-Expression, die Transition ist dadurch zeitlich verzögert (Huala et al. 1992) (Abb. 7). Reinhardt et al. zeigten im Jahre 2003, dass auch Auxin in dieser Kaskade als Aktivator fungieren kann.



2.4.3 Entwicklung von Hochrosetten

Einer der fundamentalsten Unterschiede zwischen der Entwicklung von Pflanzen und Tieren ist, dass die Körperform der Tiere bereits während der Embryogenese festgelegt ist. In Pflanzen wird dieser „Bauplan“ erst während der postembryonalen Entwicklung durch das SAM und RAM angelegt. Nach der Transition sollte die Pflanze die Entwicklung der Rosettenblätter einstellen und Kaulinblätter sowie Infloreszenzen ausbilden. Beim Wildtyp initiiert das SAM an seinen Flanken Blattprimordien während der vegetativen Phase. Bei dem spät blühenden *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Sy-0 entwickeln die lateralen Meristeme Hochrosetten anstelle von Seitensprossen und Blühorganen an den Nodien entlang des Stängels (Grbic et al. 1996, Poduska et al. 2003).

2.4.4 Mutanten mit verminderter Anzahl an Verzweigungen

Mutanten mit verändertem Verzweigungsmuster können in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Zu den Mutanten mit reduzierter Verzweigung zählt unter anderem *revoluta* (=rev) deren Seitentriebe in allen Blattachsen unterdrückt ist (Talbert et al. 1995). Das *REV* Gen wird in vasculärem Gewebe exprimiert. Zhong et al. zeigten im Jahre 2001 einen Zusammenhang zwischen einem reduzierten Auxintransport in *interfascicular fiberless1* (=ifl) Mutanten und der Unterdrückung der Seitentriebentwicklung.

Ein Phänotyp mit reduziertem Verzweigungsmuster konnte auch für die Mutante *pinhead/zwille* (=pnh/zll) nachgewiesen werden (Barton et al. 1995, Lynn et al. 1999). Die entsprechenden Mutanten entwickeln neben einem veränderten Verzweigungsmuster auch vergrößerte Meristeme und verdickte Schoten. Der Phänotyp der *las* Mutante der GRAS-Proteinfamilie zeichnet sich dadurch aus, dass in den Achseln der Rosettenblätter die Lateralmeristeme unterdrückt sind. Im Jahre 2003 konnten Li et al. eine Mutation im orthologen Gen *MOC1* aus Reis nachweisen. In der Mutante *moc1* ist die Anlage der Seitentriebe in Reis reduziert.

2.4.5 Mutanten mit erhöhter Anzahl an Verzweigungen

Zu den Mutanten mit vermehrter Verzweigung gehört unter anderem die Mutante *auxin resistant1* (=axr1) (Romano et al. 1991, Chatfield et al. 2000). Die pleiotrope Mutante entwickelt einen Phänotyp mit verlängerten Wurzeln, einer verminderten Anzahl an Lateralwurzeln und sie zeigt keine apikale Dominanz des Hauptsprosses mehr gegenüber den Seitensprossen (Phillips et al. 1975). Desweiteren entwickelt die Mutante kurze, fragile Schoten und eine geringe Fertilität. Durch eine verminderte Stängel- und Hypokotylelongation ergibt sich eine verminderte Gesamtlänge der Pflanze (Lincoln et al. 1990, Romano et al. 1991, Stirnberg et al. 1999). Das AXR1 Protein ist unter anderem in den Meristemen der Pflanze aktiv (Hillmann et al. 1975). Die Mutante *axr1* zeigt eine reduzierte Reizantwort auf IAA Stimulation (Lincoln et al. 1990, Lyser et al. 1993, Evans et al. 1994). Bisherige Studien lassen vermuten, dass AXR1 die ubiquitinabhängige Degradation regulatorischer Proteine moduliert (del Pozo et al. 1998, Lyser et al. 1998).

Die Mutanten *more axillary growth* (=max) 1, -2, -3 und -4 zeigen in ihrem Habitus ein verstärktes Verzweigungsmuster (Sorefan et al. 2003). Sowohl die Mutante *max1-1* als auch die Mutante *max2-1* entwickeln mehr Triebe aus der Rosette als der zu vergleichende Wildtyp. Die Proteine MAX1, MAX3 und MAX4 sind in die Synthese eines bisher noch nicht identifizierten Hormons involviert. Dabei handelt es sich vermutlich um ein Karotinoid-Derivat, dass die Verzweigung der Pflanzen inhibiert (Booker et al. 2005, Lazar et al. 2006). Die Gene *MAX3* und *MAX4* kodieren jeweils für ein Proteine der Karotinoid-Dioxygenase Familie (Sorefan et al. 2003, Booker et al. 2004, Snowden et al. 2005). Für *MAX3* konnte eine Karotinoid-Spaltungsaktivität nachgewiesen werden. Das Protein MAX2 hat seine Funktion in der Hormon-Wahrnehmung. In den *max* Mutanten ist eine Akkumulation von PIN1 Proteinen und anderer Auxintransporter nachweisbar (Aida et al. 2002, Bennett et al. 2006), was zu einer stärkeren Verzweigung der *max* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp führt.

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vor einigen Jahren beschriebene GRAS-Protein Familie scheint in verschiedenen Aspekten der Signaltransduktion und Entwicklung von Pflanzen wichtige regulierende Aufgaben zu übernehmen. Im Vorfeld der Versuche war bekannt, dass diese Gen-Produkte einer großen Proteinfamilie angehören, die ausschließlich in Pflanzen zu finden ist. Von einigen Mitgliedern wusste man, dass sie am Signalweg der Gibberellinsäure (Pysh et al. 1999, Willige et al. 2007), der Lichtsignaltransduktion (Bolle et al. 2000) und an verschiedenen Entwicklungsprozessen (DiLaurenzio et al. 1996, Peng et al. 1997, Schumacher et al. 1999, Sabatini et al. 2003) beteiligt sind. Über die biochemische Funktion der meisten Proteine weiß man bisher noch wenig. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit galt der Charakterisierung der GRAS-Proteine SCL 8, 23 und 31. Mithilfe reverser Genetik sollte die Funktion der Proteine SCL8, SCL23 und SCL31 geklärt werden. Dafür war es nötig, Linien mit einer Mutation in den Genen *SCL8*, *23* und *31* zu isolieren. Überexpressionslinien wurden mit Hilfe von *SCL*-Gen-*GFP* Konstruktionen erzeugt, wobei vor die kodierende Sequenz dieser Gene ein 35S-Promotor des *Cauliflower Mosaic Virus* fusioniert wurde. Dadurch wurde eine konstitutive Expression des nachgeschalteten Gens erreicht. In Mutanten und Überexpressionslinien sollten dann verschiedene physiologische Parameter beobachtet werden. Dazu gehörten die Hypokotyllänge unter Einfluss verschiedener Hormon- und Nährstoffmedien, Phyllotaxis, Größe, Wurzelwachstum, Blühzeit und Fertilität. Von besonderem Interesse war dabei der Einfluss von Phytohormonen auf den Phänotyp der Linien.

In weiteren Studien sollten mit Hilfe von Promotor-*GUS*-Konstruktionen Expressionsstudien zu den Genen *SCL8*, *23* und *31* durchgeführt werden, um die räumliche und zeitliche Expression aufzuklären. Außerdem sollte der Einfluss verschiedener Stressoren sowie Hormone auf die Expression von *SCL8*, *23* und *31* beobachtet werden und durch Microarray-Daten gestützt werden. Die Analysen wurden an *Arabidopsis thaliana*, auch unter der deutschen Bezeichnung Ackerschmalwand bekannt, durchgeführt. Dieser Modellorganismus ist inzwischen vollständig sequenziert und daher für die Untersuchung biologischer und insbesondere molekulargenetischer Fragestellungen prädestiniert. Des Weiteren war es von Interesse, die Proteine auf ihre subzelluläre Lokalisierung, Transaktivierungsaktivität und ihrer Fähigkeit zur Dimerisierung hin zu untersuchen sowie die dafür verantwortlichen Sequenzen einzugrenzen. Diese Untersuchungen erlaubten eine Einordnung der drei GRAS-Proteine bezüglich ihrer biologischen Funktion.

3 Ergebnisse

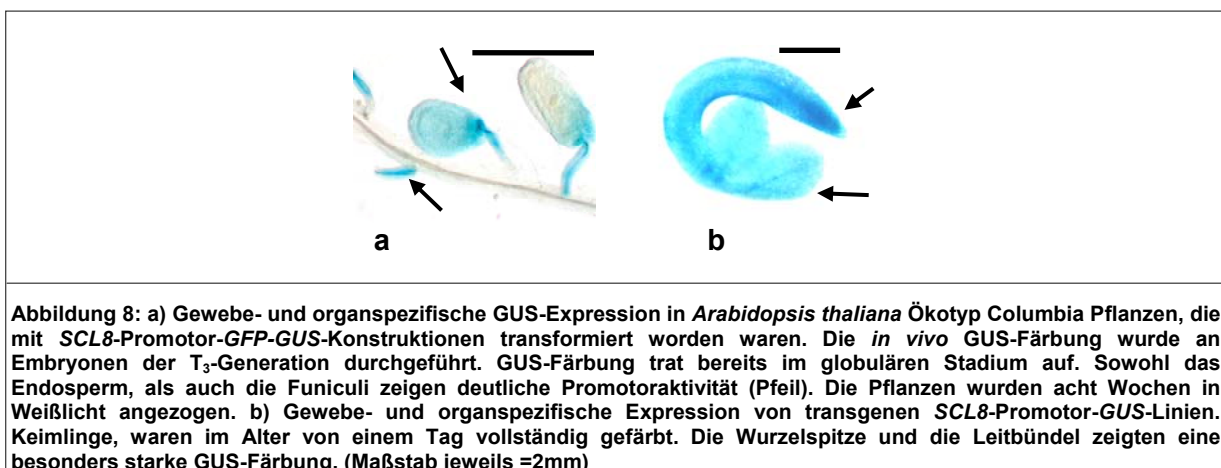
3.1 Expressionsanalysen der Gene *SCL8*, 23 und 31

3.1.1 Die Promotor-*GUS*-Fusionen in *Arabidopsis thaliana*

Mit Hilfe von Promotor-*GUS*-Experimenten lassen sich erste Erkenntnisse darüber sammeln, in welchen Geweben oder Organen der Promotor eines Gens aktiv ist. Diese Methode ermöglicht Rückschlüsse über den Wirkungsort eines bestimmten Proteins zu ziehen (Jefferson et al. 1987). Das Vollängen-Gen wurde jeweils in einen „Eintritts-Vektor“ kloniert und von dort aus in einen Vektor des Gateway-Systems® ligiert. Die Vektoren waren so konstruiert, dass an den zu charakterisierenden Promotor ein *GUS*-Reportergen fusioniert wurde, das es ermöglichte, die Expression in der Zelle zu detektieren. Nach Selektion der Klone durch geeignetes Antibiotikum wurden die Promotor-*GUS*-*GFP*-Konstruktionen via *Agrobacterium tumefaciens* in *Arabidopsis thaliana* transformiert (Clough et al. 1998). Am nächsten Tag konnten blau gefärbte Zellen und Organe, die über Nacht mit X-Gluc inkubiert wurden, identifiziert werden.

3.1.1.1 *SCL8*-Promotor-*GUS*-Fusionen

Für die Analyse der *SCL8*-Expression wurden Untersuchungen mit *SCL8*-Promotor-*GUS*-Konstruktionen durchgeführt. Zunächst wurde ein 1214 Bp langes Promotorfragment synthetisiert und in den Vektor pKGWFS7.0 kloniert. Die Reportergene *GUS* und *GFP* ermöglichten es den Promotor in den Zellen zu detektieren. Es wurde hauptsächlich mit dem *GUS*-Reporter gearbeitet. Die Aktivität des *SCL8*-Promotors konnte bereits, in dem sich in der Mutterpflanze entwickelnden Embryo festgestellt werden (Abb. 8). Es war ein deutliches Signal sowohl im Endosperm als auch den Funiculi (Abb. 8a), dem Gewebe, das die Samen mit der Mutterpflanze verbindet, zu finden. Charakteristisch für Keimlinge im Alter von einem Tag war eine starke Blaufärbung in allen Geweben. Sowohl die Wurzelspitze als auch die Leitbündel waren besonders intensiv gefärbt (Abb. 8b).



Beobachtete man die weitere Entwicklung der Keimlinge, so fand sich GUS-Reporteraktivität in vier Tage alten Pflänzchen vor allem in den Kotyledonen. In sechs bis acht Tage alten Keimlingen zeigte sich, dass sich die GUS-Färbung und somit die Promotoraktivität vor allem in den Leitbündeln der Blätter, dem apikalen Meristem und dem Übergang zwischen Hypokotyl und Wurzel nachzuweisen war (Abb. 9b-d). Die Promotoraktivität war also zunächst auf die oberirdischen Teile der Pflanze beschränkt.

Die GUS-Färbung der Blätter nahm zwischen dem Embryonalstadium (Abb. 8a) und dem vierten Tag (Abb. 9b) ab, bis sie im Alter von sechs Tagen nur noch in den Leitbündeln der Blätter zu erkennen war und am Übergang von Hypokotyl und Wurzel (Abb. 9c). Sehr deutlich zu sehen war die Blaufärbung am sechsten Tag am Übergang zwischen Wurzel und Hypokotyl (Abb. 9d) und in den Wurzelhaaren dieser Zone. Im Bereich der Wurzeln war die Promotoraktivität vor allem in den Wurzelspitzen und in den Perizykelzellen zu erkennen (Abb. 9e-g).

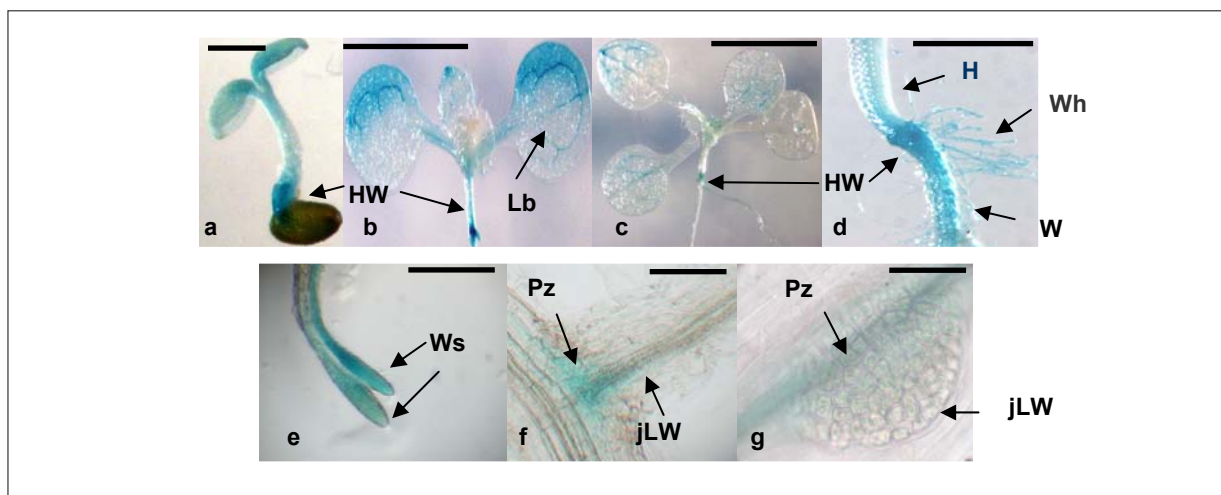
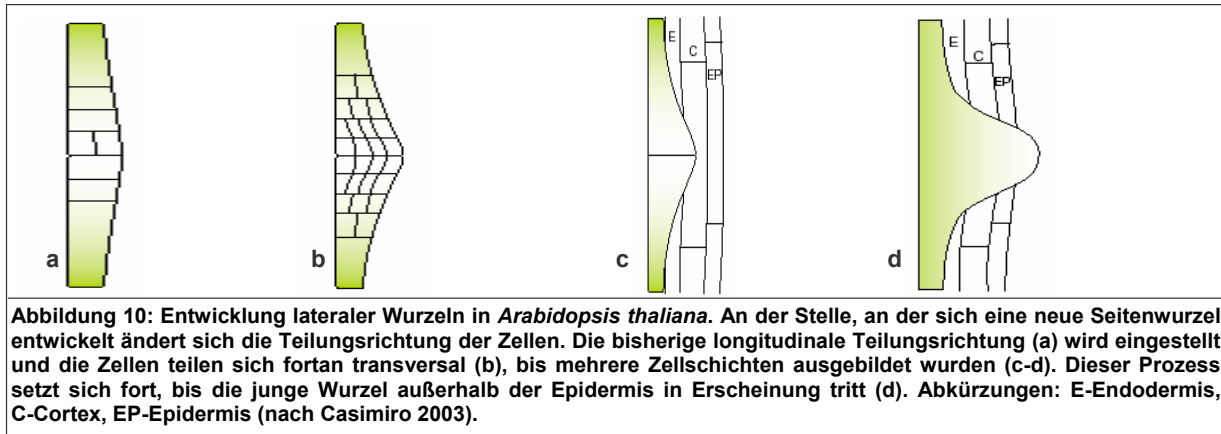


Abbildung 9: Gewebe- und organspezifische Expression von *Arabidopsis thaliana* SCL8-Promotor-GUS-Konstruktionen. *In vivo*-GUS-Färbung von in Weißlicht angezogenen Keimlingen der T₃-Generation im Alter von 4-8 Tagen. a) In zwei Tage alten Keimlingen zeigte sich GUS-Färbung insbesondere in den Kotyledonen und am Übergang von Hypokotyl und Wurzel. b) In vier Tage alten Keimlingen konnte GUS-Färbung in den Leitbündeln der Blätter, dem apikalen Meristem sowie am Übergang zwischen Wurzel und Hypokotyl detektiert werden. c) In sechs Tage alten Pflanzen war nur noch leichte Blaufärbung in den Leitbündeln der Blätter, im apikalen Meristem und am Übergang zwischen Wurzel und Hypokotyl zu finden. d) Detailaufnahme der GUS-Färbung am Übergang zwischen Wurzel und Hypokotyl und in den Wurzelhaaren eines sechs Tage alten Keimlings. e) Färbung der Wurzelspitzen von Seitenwurzeln acht Tage alter Keimlinge. f) GUS-Färbung einer Wurzelverzweigung bei 20-facher Vergrößerung, durchgeführt bei einem Keimling im Alter von 8 Tagen. g) Detailaufnahme einer sich entwickelnden Seitenwurzel. Abkürzungen: HW=Übergang zwischen Hypokotyl und Wurzel, Lb=Leitbündel, H=Hypokotyl, Wh=Wurzelhaare, W=Wurzel Pz=Perizykelzellen, Lw=Lateralwurzeln, jLW=junge Lateralwurzeln, Ws=Wurzelspitze. (Maßstab a= 2mm; b-e=1 cm, f=5mm, g-h=50µm).

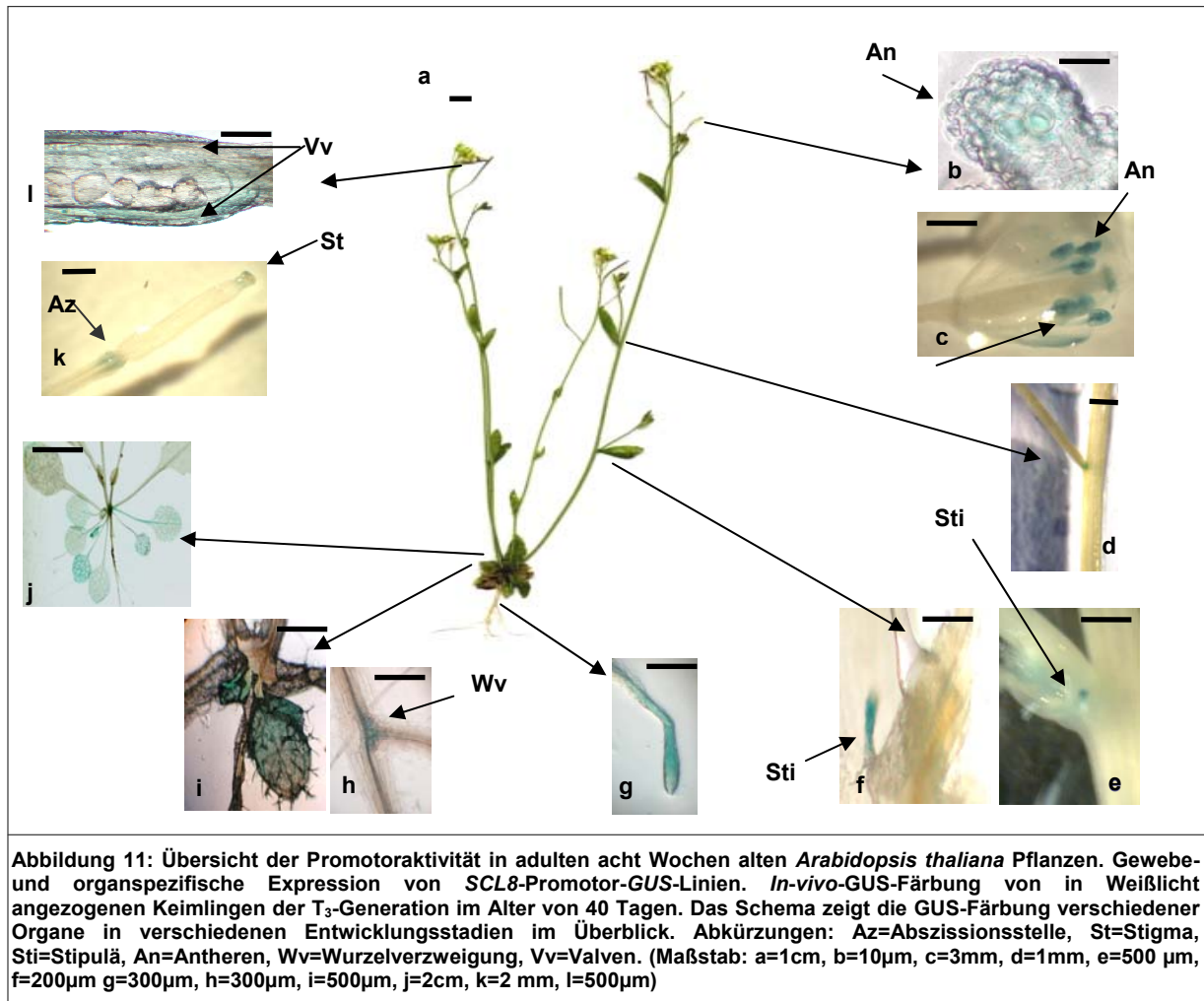
Der Begriff Perizykel (=Pericambium) bezeichnet eine innere Gewebeschicht der Wurzel. An diesen Perizykelzellen beginnt die Bildung der lateralen Wurzeln, hervorgerufen durch die Änderung der Teilungsrichtung von einer longitudinalen Teilungsrichtung hin zur transversalen Teilungsänderung (Abb. 10a-b) (Casimiro et al. 2003).

Es kommt dabei zu einer asymmetrischen Zellteilung. Sie durchdringen dabei die Endodermis und den Cortex (Abb. 10c). Schließlich tritt die junge Wurzel durch die Epidermis nach außen (Abb. 10d).



In adulten acht Wochen alten Pflanzen konnte GUS-Färbung in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 11 dargestellt, waren der Pollen (Abb. 11b), sowie das Stigma (=Narbe) (Abb. 11k) und die Kelchblätter (Abb. 11c) blau gefärbt. Die Blaufärbung konnte auch in den Stipulä (=Nebenblätter) (Abb. 11d-f) nachgewiesen werden. Die Wurzeln (Abb. 11g) und die Wurzelverzweigungen (Abb. 11h) waren gefärbt. Ebenso konnte Färbung in Rosettenblättern (Abb. 11i) und seneszenten Blättern nachgewiesen werden (Abb. 11j). Die Abszissionszone (=Abwurfzone) (Abb. 11k) der Schoten und die beiden Valven (=Hülsen) der Schoten (Abb. 11l) waren ebenfalls blau gefärbt.

Nicht gefärbt waren hingegen der Griffel (=Style) und die Staubfäden, junge Blütenblätter, der Pflanzenstängel und die Tragblätter der Pflanzen. Promotoraktivität konnte vor allem in Geweben detektiert werden, die in entwicklungsbiologischen und meristematischen Prozessen involviert sind.



3.1.1.1.1 *SCL8*-Promotor-*GUS*-Linien unter Einfluß von ABA

Die Promotor-*GUS*-Linien wurden auf verschiedenen Hormon-Medien angezogen, wie zum Beispiel ABA, um eventuelle Unterschiede in der räumlichen Verteilung der Expression zu analysieren. Zur Kontrolle wurden die Linien auch auf Medium ohne ABA angezogen. Der Vergleich zwischen Linien die auf 15 µM ABA-Medium gewachsen waren und solchen die sich ohne ABA entwickelten macht deutlich, dass unter Einwirkung von ABA die Promotoraktivität nur in der Wurzel (Abb. 12a-b) bzw. am Übergang zwischen Wurzel und Hypokotyl zu sehen war (Abb. 12c). In den oberirdischen Regionen der Pflanzen ließ sich bis zum achten Tag der Entwicklung kein GUS-Signal nachweisen. Hingegen war in Keimlingen gleichen Alters, die ohne ABA (Abb. 12d-f) angezogen wurden, Blaufärbung auch in den oberirdischen Teilen der Pflanzen zu erkennen.

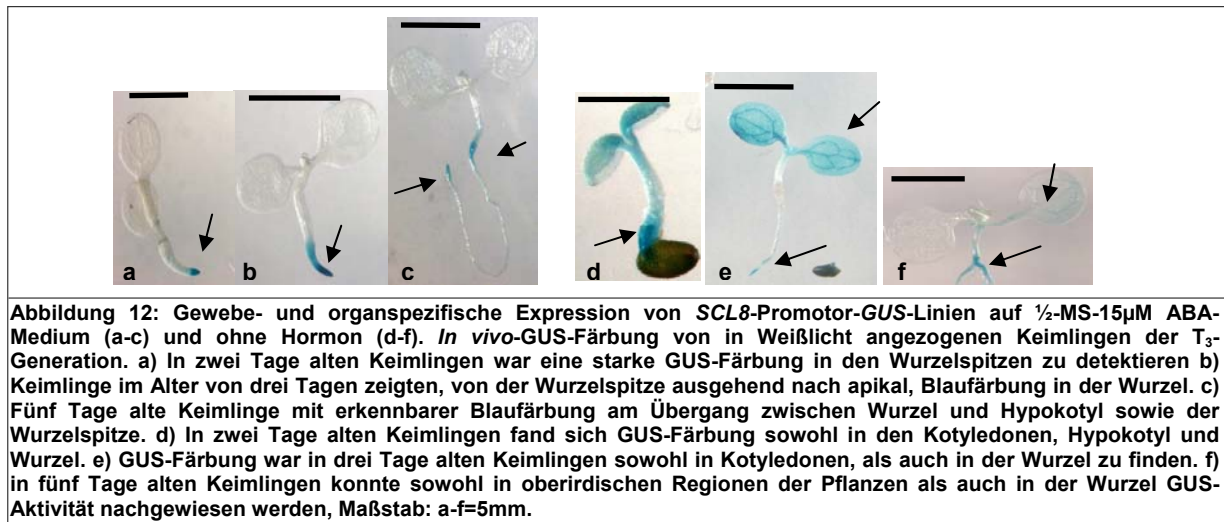
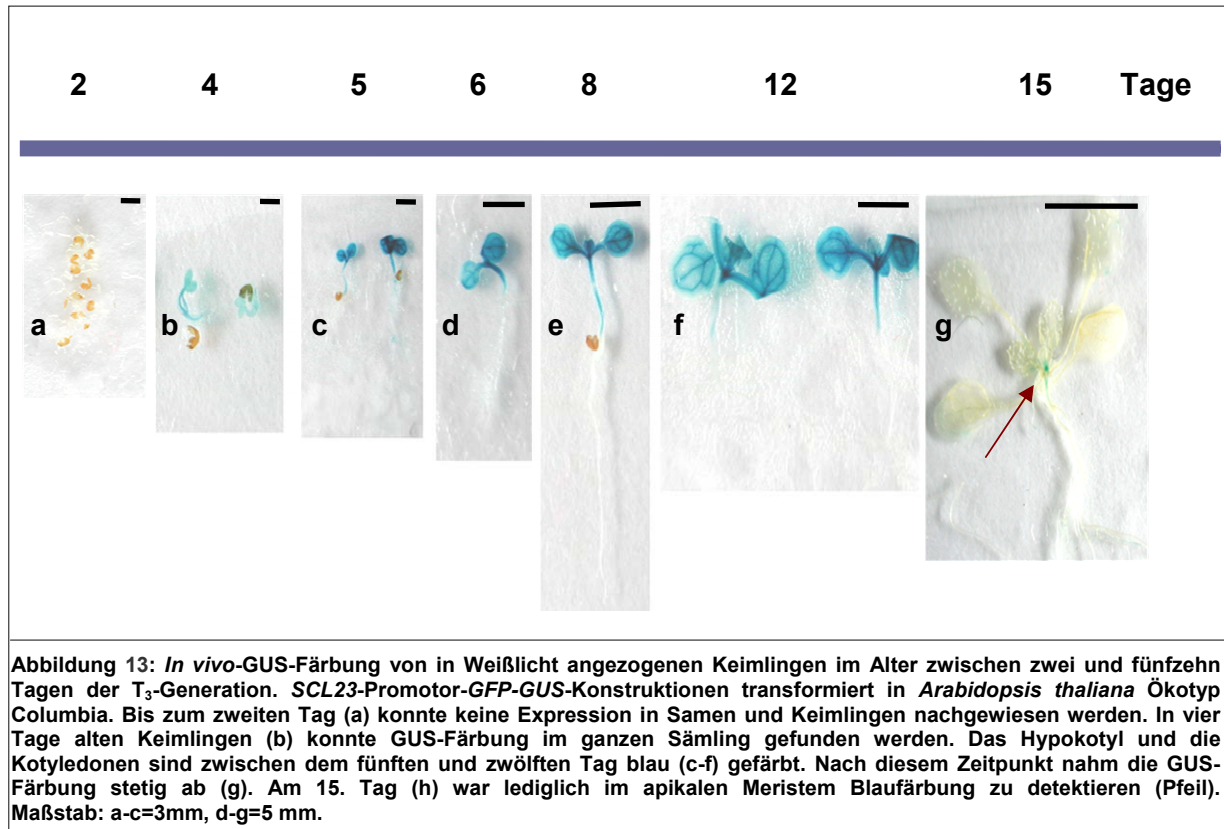


Abbildung 12: Gewebe- und organspezifische Expression von *SCL8*-Promotor-*GUS*-Linien auf $\frac{1}{2}$ -MS-15µM ABA-Medium (a-c) und ohne Hormon (d-f). *In vivo*-GUS-Färbung von in Weißlicht angezogenen Keimlingen der T_3 -Generation. a) In zwei Tage alten Keimlingen war eine starke GUS-Färbung in den Wurzelspitzen zu detektieren b) Keimlinge im Alter von drei Tagen zeigten, von der Wurzelspitze ausgehend nach apikal, Blaufärbung in der Wurzel. c) Fünf Tage alte Keimlinge mit erkennbarer Blaufärbung am Übergang zwischen Wurzel und Hypokotyl sowie der Wurzelspitze. d) In zwei Tage alten Keimlingen fand sich GUS-Färbung sowohl in den Kotyledonen, Hypokotyl und Wurzel. e) GUS-Färbung war in drei Tage alten Keimlingen sowohl in den Kotyledonen, als auch in der Wurzel zu finden. f) In fünf Tage alten Keimlingen konnte sowohl in oberirdischen Regionen der Pflanzen als auch in der Wurzel GUS-Aktivität nachgewiesen werden, Maßstab: a-f=5mm.

3.1.1.2 *SCL23*-Promotor-*GUS*-Fusionen

Im Rahmen der Charakterisierung von *SCL23* wurden Pflanzen des Wildtyps Columbia mit einer *SCL23*-Promotor-*GUS*-*GFP*-Fusionskonstruktion transformiert. Für die *SCL23* Expressionsanalyse wurde zunächst das Promotorfragment mit einer Länge von 2352 Bp amplifiziert und in den Vektor pKGWFS7.0 kloniert. Die Keimlinge zeigten, ab dem fünften Tag (Abb. 13) ausschließlich in den oberirdischen Pflanzenteilen Blaufärbung. Dieses Ergebnis war zunächst überraschend, da *SCL23* phylogenetisch nah verwandt zu *SCR* ist und *scr* Mutanten einen deutlichen Wurzelphänotyp zeigen (DiLaurenzio et al. 1996, Sabatini et al. 2002, Nishiyama et al. 2003). Deutlich zu erkennen war die entwicklungsabhängige GUS-Färbung der Pflanzen (Abb. 13).

Bis zum zweiten Tag (Abb. 13a) nach der Keimung konnte zunächst keine GUS-Färbung detektiert werden. Am vierten Tag war das Signal im oberirdischen Teil des Keimlings zu erkennen (Abb. 13b). Fünf Tage nach der Keimung war die Färbung ausschließlich in Hypokotyl und Kotyledonen der Keimlinge zu detektieren (Abb. 13c-f). Nach dem zwölften Tag nahm die Promotoraktivität deutlich ab, bis sie am Tag fünfzehn (Abb. 13g) lediglich noch im apikalen Meristem zu finden war. Nach dieser Zeit konnte keine Promotoraktivität mehr mittels GUS-Färbung nachgewiesen werden. Der Promotor von *SCL23* ist also zwischen dem vierten und fünfzehnten Tag aktiv und das Protein *SCL23* vermutlich während dieser Zeit an entwicklungsrelevanten Prozessen der oberirdischen Pflanzenentwicklung beteiligt.



3.1.1.3 *SCL31*- Promotor-*GUS*-Fusionen

SCL31-Promotor-*GUS-GFP*-Fusionskonstruktionen wurden in Pflanzen der Wildtyplinie Columbia transformiert. Zu Beginn der *SCL31*-Expressionsanalyse wurde das Promotorfragment mit einer Länge von 2410 Bp amplifiziert und in den Vektor pKGWFS7.0 kloniert. Die Aktivität dieses Promotors war vor allem in meristematischem und entwicklungsrelevantem Gewebe nachweisbar (Abb. 14). Zu dieser Art von Gewebe zählen vor allem das apikale Sprossmeristem und die meristematischen Zellen der Wurzel.

GUS-Färbung des apikalen Meristems zeigte sich in Keimlingen ab dem Alter von drei bis sechs Tagen (Abb. 14a-c). In zehn Tage alten Keimlingen konnte GUS-Färbung im apikalen Meristem, am Blattrand und in sich entwickelnden Seitenwurzeln nachgewiesen werden (Abb. 14d). Im Alter von zwölf bis fünfzehn Tagen fand sich GUS-Färbung im apikalen Meristem und nur noch marginal in den Kotyledonen (Abb. 14e). In zwanzig Tage alten Pflanzen konnte GUS Färbung in meristematischen Geweben des Sprosses und der Wurzel detektiert werden (Abb. 14g).

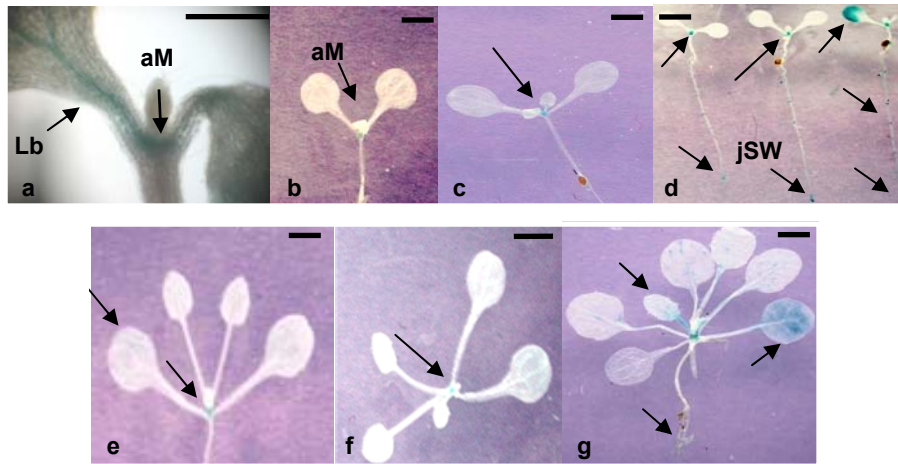


Abbildung 14: *SCL31*-Promotor-*GFP-GUS*-Konstruktion wurde in *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia transformiert. *In vivo*-GUS-Färbung von in Weißlicht unter Kurztag angezogenen Keimlingen auf Gewebekultur im Alter zwischen drei bis vierzig Tagen der T_3 -Generation. a) GUS-Färbung des apikalen Meristems eines Keimlings im Alter von drei Tagen. b) Keimling im Alter von vier Tagen mit blau gefärbtem Apikalmeristem. c) Blaufärbung des apikalen Meristems eines sechs Tage alten Keimlings. d) In zehn Tage alten Keimlingen zeigte sich GUS-Färbung im apikalen Meristem, am Blattrand und in sich entwickelnden Seitenwurzeln. e) GUS-Färbung zeigte sich in zwölf Tage alten Keimlingen im apikalen Meristem und marginal in den Kotyledonen (Pfeile). f) Färbung eines fünfzehn Tage alten Keimlings. Blaufärbung war im apikalen Meristem zu detektierbar. g) Zwanzig Tage alte Pflanze mit GUS Färbung in meristematischen Geweben des Sprosses und der Wurzel. Die Pfeile kennzeichnen GUS-Färbung der sich entwickelnden Seitenwurzeln der Pflanzen. Abkürzungen: aM=apikales Meristem, Lb=Leitbündel, jSW=junge Seitenwurzel. (Maßstab: a=200µm, b-d=1mm; e-g=5mm).

In Abbildung 15 (a-e) sind deutlich die Stellen entlang der Hauptwurzel zu erkennen, an denen sich gerade Seitenwurzeln entwickeln. Die Aktivität des Promotors konnte bereits in den Perizykelzellen während der sehr frühen Entwicklung der Seitenwurzel in (Abb. 15a) nachgewiesen werden.

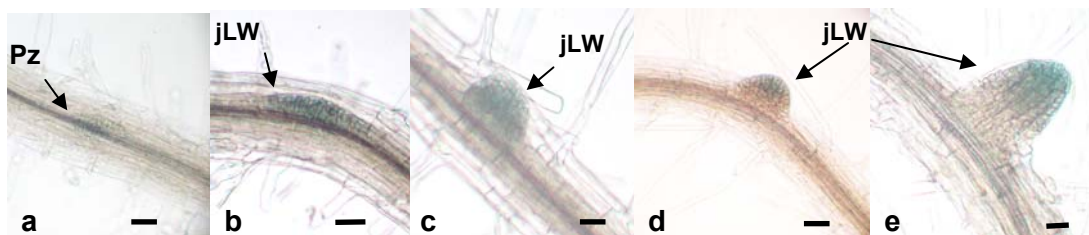
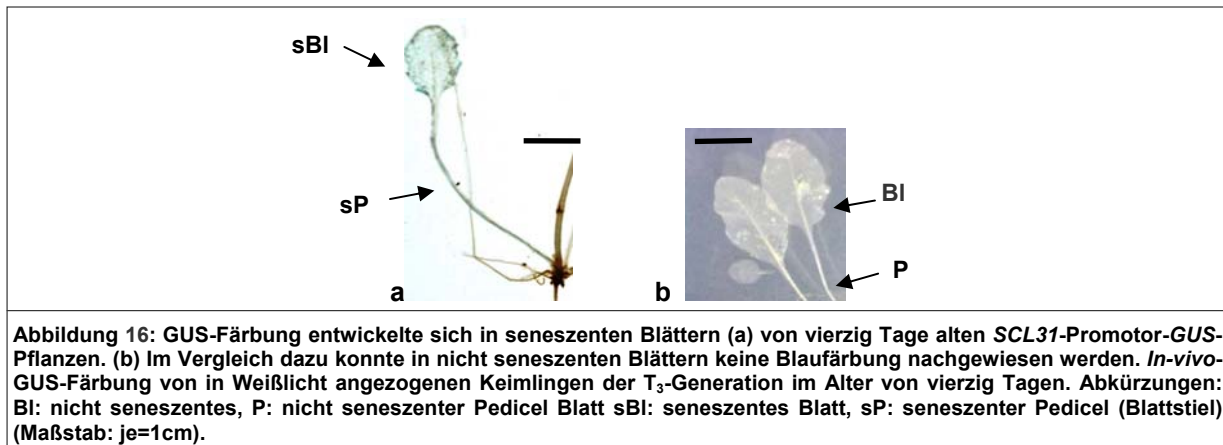
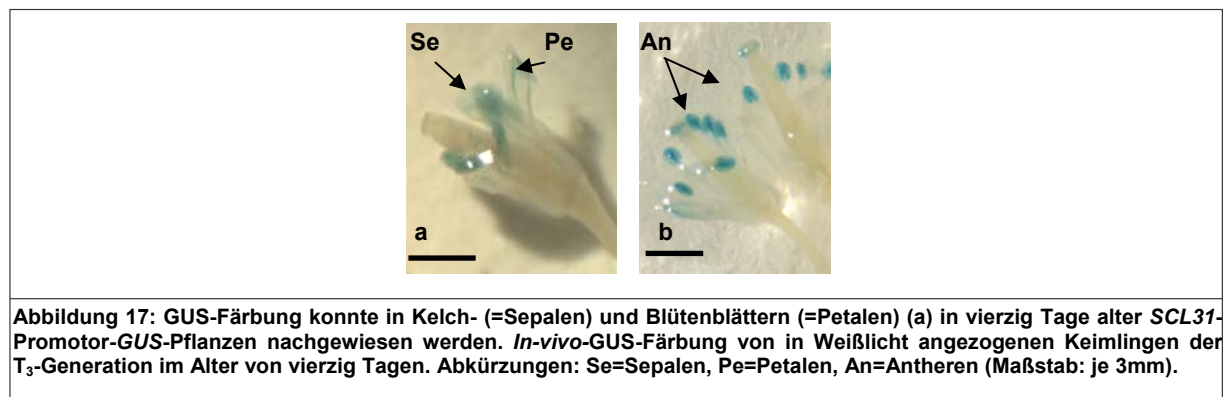


Abbildung 15: (a-e) Entwicklung lateraler Wurzeln. Pflanzen der Linie *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia wurde mit einer *SCL31*-Promotor-*GFP-GUS*-Konstruktion transformiert. *SCL31* Promotoraktivität konnte im meristematischen Gewebe neu entstehender Wurzeln gezeigt werden (Pfeil). *In-vivo*-GUS-Färbung von in Weißlicht angezogenen Keimlingen der T_3 Generation im Alter zwischen acht und zehn Tagen. Abkürzungen: Pz=Perizykelzellen, jLW=junge Lateralwurzel, Wh=Wurzelhaare. (Maßstab: a=100µm, b,c=50µm, d=100µm, e=50µm).

Nach 40 Tagen konnte GUS-Färbung in seneszenten Blättern (Abb. 16a) und Blattstielen von auf Erde gewachsenen *SCL31*-Promotor-*GUS*-Pflanzen detektiert werden. Im Gegensatz dazu war in nicht seneszenten Blättern (Abb. 16b) keine Blaufärbung nachweisbar.



In Kelch- und Blütenblättern vierzig Tage alter Pflanzen konnte Blaufärbung nachgewiesen werden (Abb. 17a), ebenso in den Antheren (Abb. 17b).



3.1.2 Expressionsanalysen mit Hilfe von Microarray-Technik

In den letzten Jahren wurden Mikroarray-Chips, auf denen fast alle Gene von *Arabidopsis thaliana* aufgebracht sind, mit verschiedenen RNS' hybridisiert. Mit Hilfe der AFGN-Initiative konnten die Transkriptionsmengen in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben analysiert werden (Schmidt et al. 2005). Diese Daten sind zugänglich und können mit einer Reihe verschiedener Programme wie zum Beispiel dem „Genevestigators“ und dessen Programm „Meta-Profile Analysis“ (<https://www.genevestigator.ethz.ch>) abgerufen werden (Zimmermann et al. 2004). Auch das Programm „efp-Browser“ (=“Arabidopsis electronic Fluorescent Browser“) auf der Seite www.bbc.botany.utoronto.ca (Winter et al. 2007) kann dafür genutzt werden.

Diese Programme ermöglichen vergleichende Analysen der erhaltenen Daten durchzuführen. Beim Arbeiten mit Promotor::Reporter-Gen-Konstruktionen sollte grundsätzlich bedacht werden, dass dies die Aktivität eines Reporters widerspiegelt und nicht unbedingt die tatsächliche Genexpression. Es ist möglich, dass trotz des aktiven Promotors, die entsprechende mRNA *in vivo* nicht gebildet wird bzw. zu instabil ist, um ein Genprodukt zu bilden. Experimentellen Techniken, bei denen tatsächlich die mRNA des zu untersuchenden Gens nachgewiesen wird, sind daher der Vorzug zu geben.

3.1.2.1 Expressionsanalysen des *SCL8* Gens mittels Microarray-Technik

Entsprechend der *SCL8*-Promotor-*GUS-GFP*-Fusions-Linien zeigten die Daten der Microarray Analysen (Abb. 18), dass die Expression von *SCL8* in den Wurzeln von Keimlingen, den Knospen, den Blüten- und Kelchblättern, den Schoten, und auch in den Embryonen und seneszenten Blättern erhöht waren.

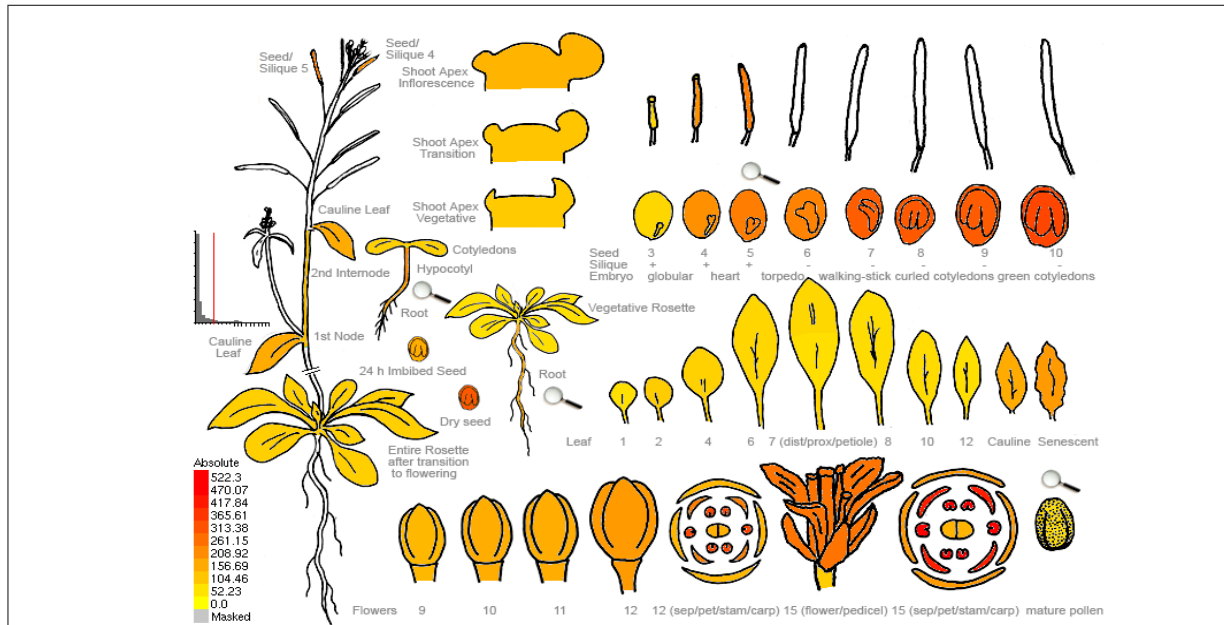


Abbildung 18: Gewebe- und organspezifische Expression von *SCL8* (At5g52510). Dargestellt werden die einzelnen Organe und Pflanzenteile, in denen *SCL8* exprimiert wird. Die Expression wird mit Hilfe eines Farbcodes dargestellt bei dem gelb (0) keine signifikante Expression bedeutet, rot (522,3) hingegen auf eine hohe Expressionsrate hinweist. Erstellt mit Hilfe des „Arabidopsis electronic Fluorescent Browsers“ der Seite www.bbc.botany.utoronto.ca.

3.1.2.1.1 Einfluss von ABA auf die Expression von *SCL8*

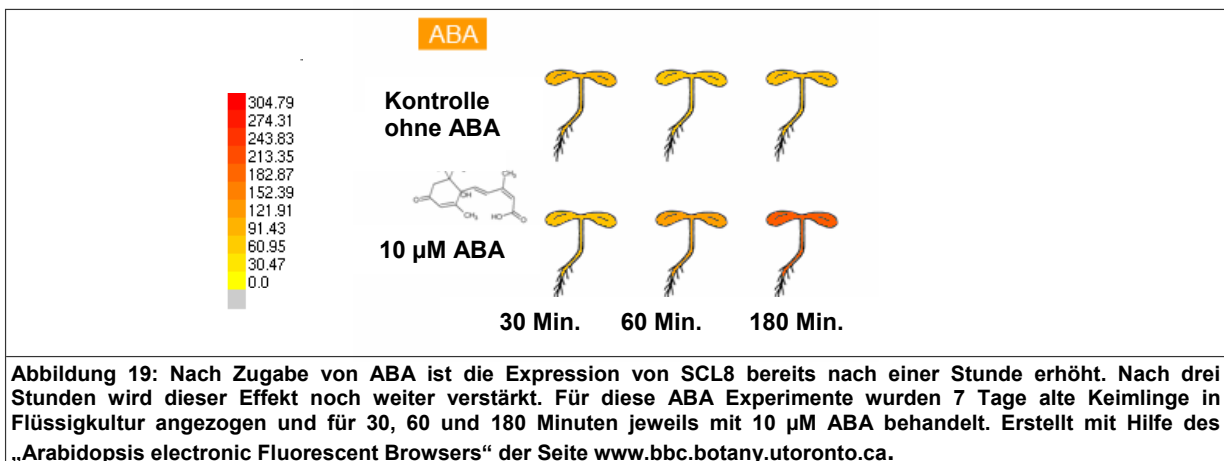
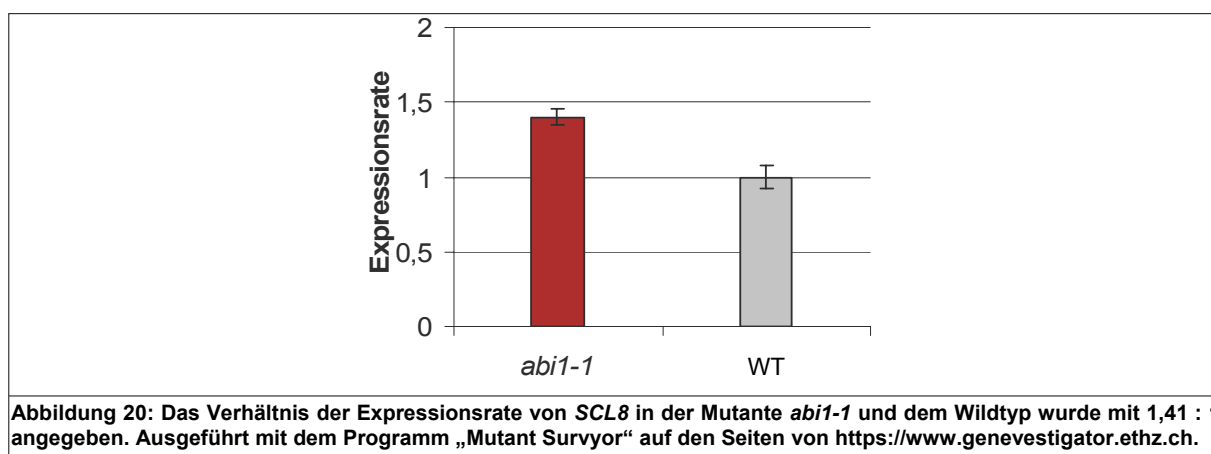


Abbildung 19: Nach Zugabe von ABA ist die Expression von *SCL8* bereits nach einer Stunde erhöht. Nach drei Stunden wird dieser Effekt noch weiter verstärkt. Für diese ABA Experimente wurden 7 Tage alte Keimlinge in Flüssigkultur angezogen und für 30, 60 und 180 Minuten jeweils mit 10 μ M ABA behandelt. Erstellt mit Hilfe des „Arabidopsis electronic Fluorescent Browsers“ der Seite www.bbc.botany.utoronto.ca.

Sämtliche Hormonanalysen wurden an sieben Tage alten *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia Keimlingen durchgeführt (AtGenExpress Consortium – In Riken, Japan). Grundsätzlich wuchsen die Pflanzen in flüssigem MS-Medium unter kontinuierlichen Lichtbedingungen bei 23°C. Die RNS wurde isoliert und auf den ATH1-Gen-Chip hybridisiert.

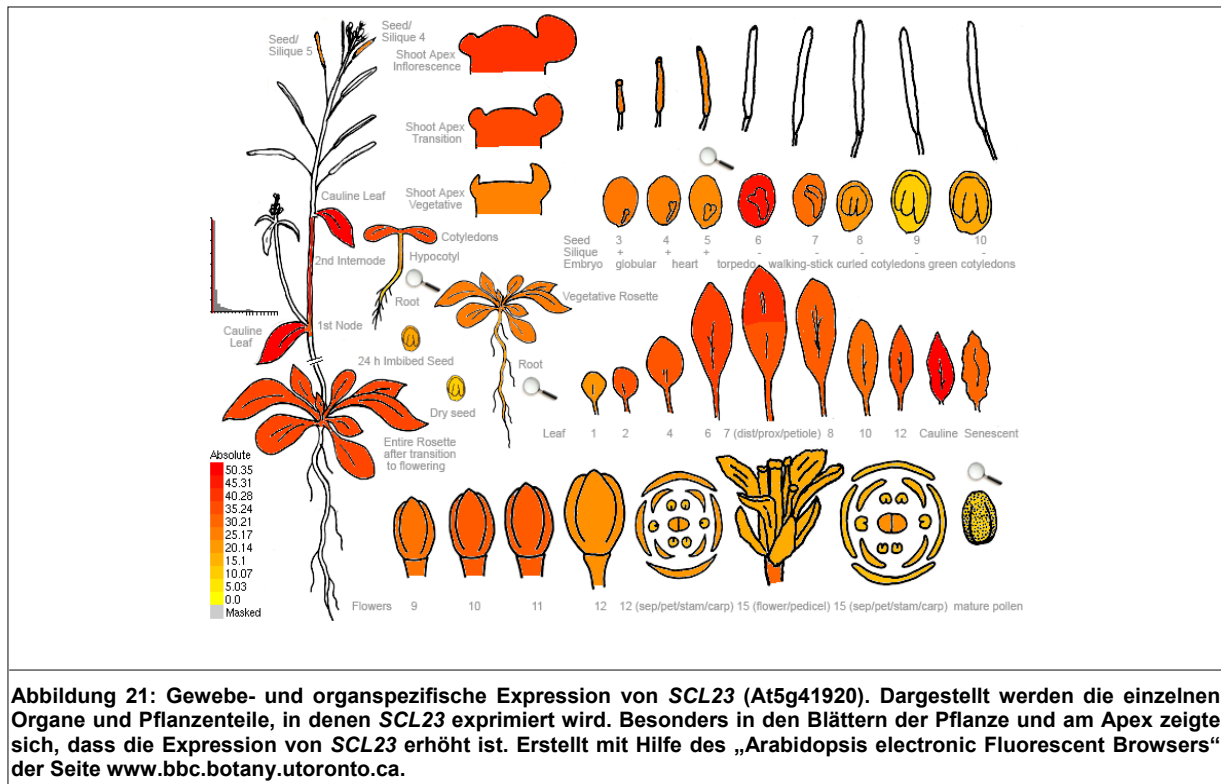
Die Farbcodierung verläuft auch in diesem Fall von gelb (0,0 geringe Expression) nach rot (304,79 starke Expression) (Abb. 19). Alle Experimente wurden zweifach durchgeführt und daraus der Mittelwert errechnet. Nachdem die Analyse der GUS-Assays zeigte, dass die Promotoraktivität in Wurzeln von Keimlingen durch ABA erhöht war (Abschnitt 3.1.1.1.1), wurde dieses Ergebnis mittels der Daten des „efp-Brwosers“ versucht zu stützen (Abb. 19). Aus den Daten war zu erkennen, dass die Expression unter ABA Einwirkung gegenüber der unbehandelten Kontrolle bereits nach einer Stunde leicht angestiegen war. Dieser Effekt verstärkte sich bis zur 180. Minute (Abb. 19). Diese Daten unterstützen die Ergebnisse der GUS-Experimente.

Das Programm „Genevestigators“ ermöglicht es in den Microarray-Daten nach Mutanten zu suchen, in denen die Expression des *SCL8* Gens verändert ist. Ebenso besteht die Möglichkeit nach Bedingungen zu suchen, die die Expressionsrate von *SCL8* ändern. Eine Mutante mit erhöhter *SCL8* Expressionsrate war *abscissin sensitiv 1* (= *abi1-1*) (Abb. 20) (Finkelstein et al. 1990, Leung et al. 1994).



3.1.2.2 Expressionsanalysen des *SCL23* Gens mittels Microarray-Technik

Die Expression von *SCL23* findet in fast allen oberirdischen Geweben und Organanteilen von *Arabidopsis thaliana* statt. Die erhaltenen Daten in Abbildung 21 stützten die Ergebnisse der GUS-Assays in Abschnitt 3.1.1.2 nur bedingt, da die Promotoraktivität durch GUS-Färbung nur in oberirdischen Teilen von bis zu zehn Tage alten Keimlingen nachgewiesen werden konnte. Hingegen wiesen die Microarray-Daten darauf hin, dass auch in adulten Pflanzen wie zum Beispiel den Knospen, Embryonen und den Tragblättern erhöhte Expression nachweisbar ist. Dies konnte durch die GUS-Färbung in Abschnitt 3.1.1.2 nicht bestätigt werden. Bemerkenswert ist, dass die absolute Höhe der Expression ist sehr gering mit einer maximalen Signalstärke von 50,35 (Abb. 21).



Die GUS-Assays und Microarray-Daten ließen bereits erkennen, dass der Promotor von *SCL23* nicht in den Wurzeln aktiv ist. Im Gegensatz dazu ist SCR ein Protein, das unter anderem in den Wurzeln nachweisbar ist (DiLaurenzio et al. 1996).

3.1.2.2.1 Einfluss verschiedener Stressoren auf die Expression von *SCL23*

Bislang fehlen Hinweise darauf, dass *SCL23* und SCR ähnliche physiologische Funktionen erfüllen könnten. Das Programm des „Genevestigators“ ermöglicht es die Expression eines Gens aufgrund der Einwirkung verschiedener Stressoren zu analysieren. Es steht eine Vielzahl verschiedener Stressexperimente im „Genevestigator Response Viewer“ zur Verfügung. Aus Gründen der besseren Übersicht wurden jedoch nur 20 dieser Stressoren in das Diagramm aufgenommen (Abb. 22). Hierzu gehörten die Auswirkung von Hormonen, verschiedenen Lichtbedingungen und abiotischer Einwirkungen. Die Microarray-Analysen legten dar, dass die Genexpression von *SCL23* vor allem unter Einwirkung von Ethylen deutlich erhöht war. Weitere Stimuli waren ACC, ein Vorläufer des gasförmigen Ethylens, und Glukose (Abb. 22), die über den Hexokinase-Synthese Weg mit dem Ethylen in Verbindung steht (León et al. 2003). Signalstärken über 1 weisen auf eine Erhöhung der Expressionsrate durch den entsprechenden Stimulus hin, weniger als 1 deutet auf eine erniedrigte Expressionsrate hin (Abb. 22). Aufgrund dieser Analyse wurden die Linien *sc123-1* und *sc123-2* sowie die Überexpressionslinie *35S::SCL23* in späteren Versuchen auf ihre Sensitivität gegenüber Ethylen und Glukose untersucht.

In physiologischen Versuchen konnte kein Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Seneszens und Kälte in Bezug auf SCL23 erbracht werden.

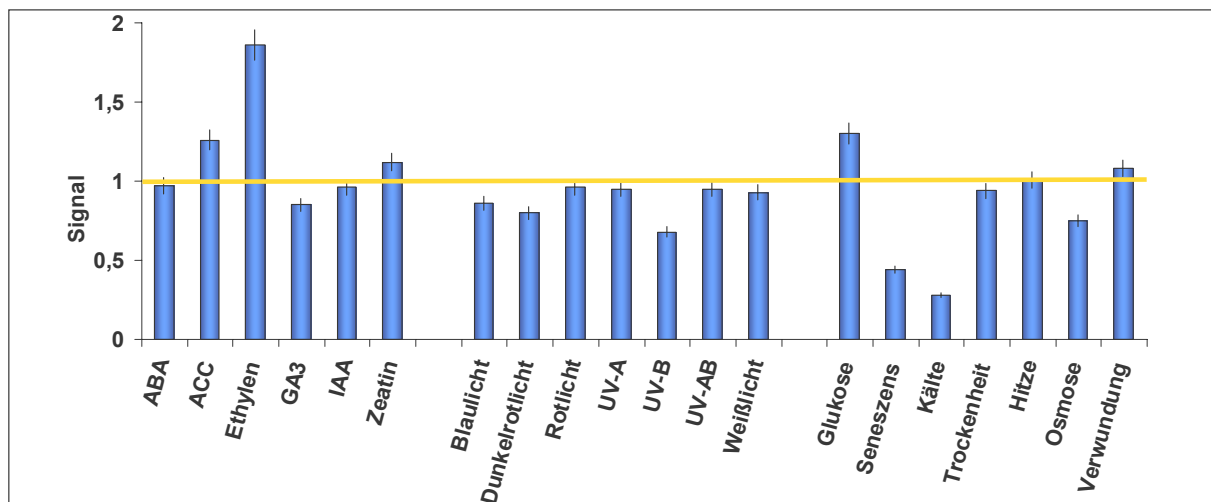
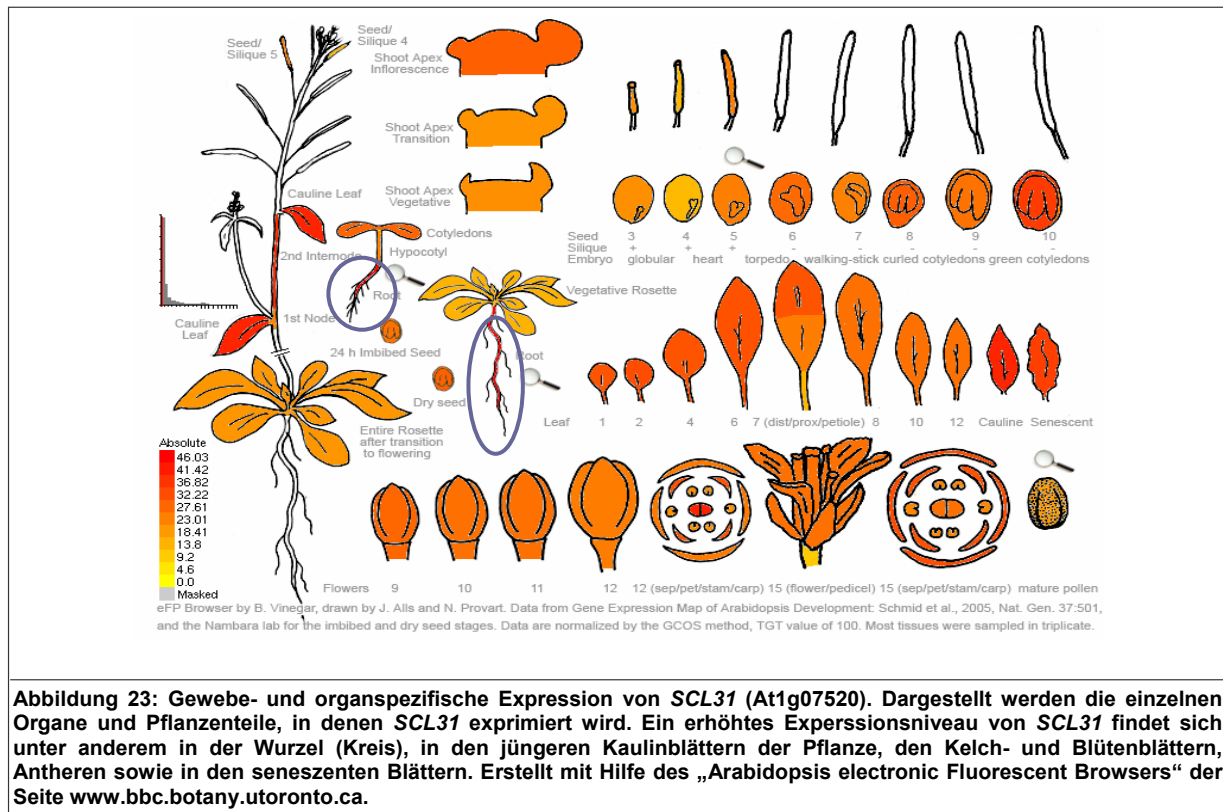


Abbildung 22: Expressionsanalyse des Gens SCL23 wurden mittels Microarray analysiert. Das höchste Expressionsniveau von SCL23 zeigte sich unter Einwirkung von Ethylen, ACC und Glukose.

3.1.2.3 Expressionsanalysen des SCL31 Gens mittels Microarray-Technik

Die Daten der GUS-Assays (Abschnitt 3.1.1.3) des Promotors von SCL31 ließen erkennen, dass vor allem in der Perizykelzellschicht der Wurzeln, den Rosettenblättern, den seneszenten Blättern, den Kelch- und Blütenblätter, sowie den Antheren transformierter Pflanzen die Expressionsrate erhöht war. Aus den Microarray-Daten war ein deutliches Signal in der Wurzel junger Keimlinge (Abb. 23, blaue Kreise) den Tragblättern, den Rosettenblättern, sowie den Kelch- und Blütenblättern und Antheren, den seneszenten Blättern und den reifen Samen zu sehen.

Die Expressionsrate von SCL31 war in der gesamten Pflanze relativ niedrig. Die Aussagen der Microarray-Daten konnten durch die darauf folgenden GUS-Experimente bestätigt werden (Abschnitt 3.1.1.3).



3.2 Isolation homozygoter Mutanten und der Überexpressionslinien

3.2.1 Nachweis der Insertion in den Mutanten mittels PCR

Eine wichtige Voraussetzung im Rahmen der Charakterisierung der Proteinfunktion von *SCL8*, *23* und *31* war zunächst homozygote Mutanten zu erhalten. Mittels reverser Genetik wurden Linien isoliert, die vor oder innerhalb des kodierenden Bereichs von *SCL8*, *23* und *31* eine Insertion enthielten. Durch das Programm „Signal T-DNA-Express Arabidopsis Gene Mapping Tool“ des Salk Institutes konnten *Arabidopsis*-Mutanten identifiziert werden, die eine Transposon-Insertion oder eine T-DNS vor oder innerhalb des *SCL8*, *23* und *31* Gens enthielten. Für die Selektion der Linien wurden die Samen, abhängig von ihrer Resistenz, auf Basta-, Kanamycin- oder Sulfadiazin-Medium ausgebracht. Keimlinge, die auf diesen Medien selektiert wurden, sind entweder homozygot oder heterozygot bezüglich ihrer Insertion.

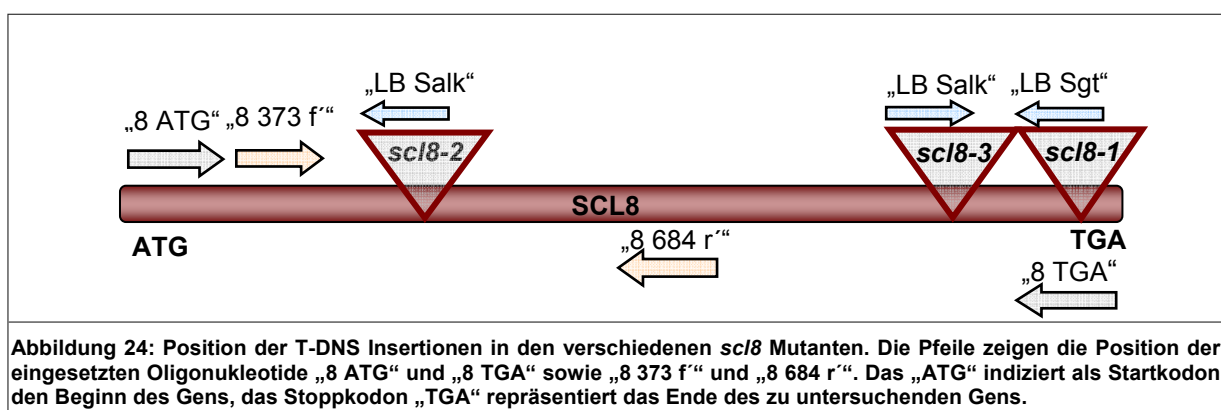
Diese Pflanzen wurden durch zwei PCR-Reaktionen bezüglich ihrer Insertion analysiert. Für die erste PCR-Reaktion wurde ein Oligonukleotid-Paar (1) eingesetzt, von dem das eine Oligonukleotid homolog zur linken Grenzregion der Insertion und das andere Oligonukleotid homolog zum jeweils zu untersuchenden Gen war. Die Oligonukleotide des zweiten Paares (2) waren jeweils homolog zur Sequenz des zu untersuchenden Gens. Es wurde nur mit solchen Linien weiter gearbeitet, die ein Amplifikat durch Oligonukleotid-Paar (1) aufwiesen, da diese Reaktion die Insertion nachweist. Die zweite Bedingung war, dass kein Amplifikat aus der PCR mit Paar (2) hervorging und so nachgewiesen werden konnte, dass dieser Genabschnitt tatsächlich die Insertion trägt.

3.2.2 Nachweis der mRNA in Mutanten und Überexpressionslinien durch RT-PCR

Zusätzlich wurde auch die Expression des Gens in den verschiedenen Linien überprüft. Es sollte der Nachweis geführt werden, dass es in den entsprechenden Linien zu keiner mRNA Expression mehr kam. Die konstitutive Überexpression der *SCL*-Gene unter der Kontrolle des 35S-Promoters des Blumenkohl-Mosaikvirus wurde mittels der Gateway-Technologie® durchgeführt und via *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Als Rezipient diente die *Arabidopsis thaliana* Linie Columbia. Das Volllängen-Gen wurde jeweils in einen „Eintritts-Vektor“ kloniert und von dort aus in einen „Überexpressions-Vektor“ pKGWFS7,0 des Gateway-Systems® ligiert. Die Überexpressions-Vektoren sind so konstruiert, dass an das jeweilige zu charakterisierende Gen ein Reportergen fusioniert wird, mit dem es möglich ist, das Protein gegebenenfalls in der Zelle zu detektieren.

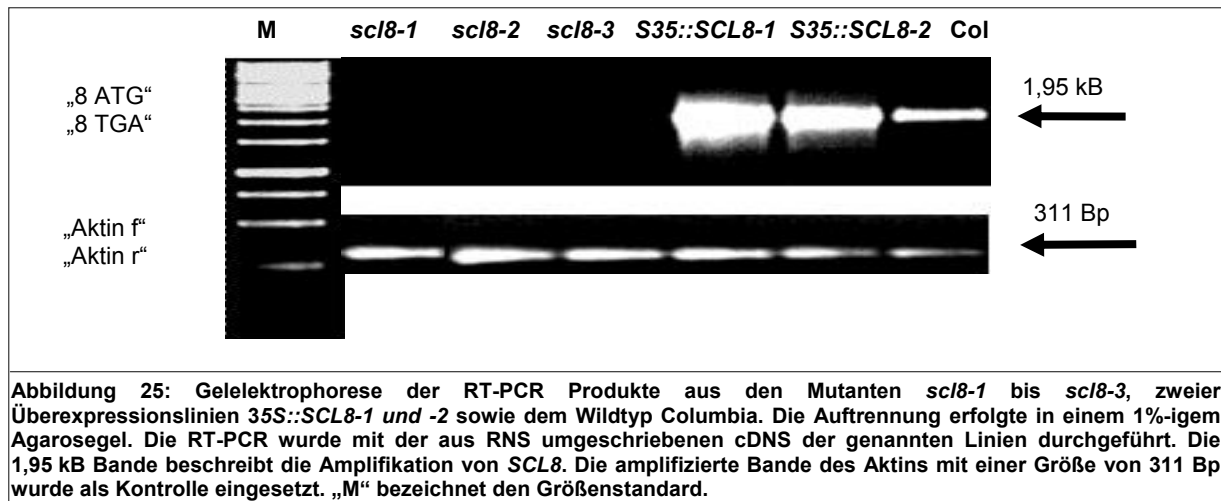
3.2.2.1 Nachweis der mRNA in *sc/8* und 35S::*SCL8*

Bei den *sc/8* Linien handelt es sich zum einen um ein Transposon Insertions-Linie *sc/8-1* (SGT 5010), deren Insertion sich 48 Basenpaare (=Bp) vor dem TGA befindet (Abb. 24). Zum anderen wurden Linien mit T-DNS Insertionen verwendet. Bei der Linie *sc/8-2* (SALK_129947) befindet sich die Insertion 1380 Bp vor dem TGA (Abb. 24). Die Insertion der dritten Mutante *sc/8-3* (SALK_102784), einer T-DNS-Insertionslinie, findet sich 152 Bp vor dem TGA (Abb. 24). Die Linie *sc/8-1* hat einen *Arabidopsis thaliana* Landsberg Hintergrund, während es sich bei den Linien *sc/8-2* und *sc/8-3* um den Ökotyp Columbia handelt. Die Grafik in Abbildung 24 zeigt sowohl die Position der Insertionen, als auch die der eingesetzten Oligonukleotide „8 ATG“ und „8 TGA“, die sich am ATG bzw. dem TGA des *SCL8* Gens befinden.

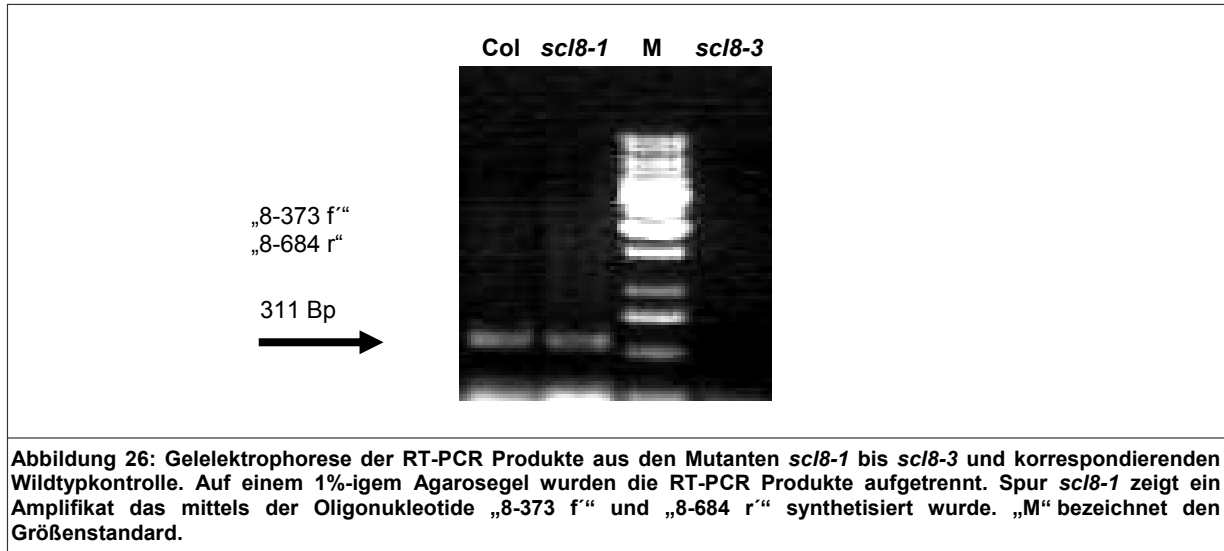


Die PCR-Reaktion wurde mit den genspezifischen Oligonukleotiden „8 ATG“ und „8 TGA“ durchgeführt (Abb. 24). Ebenso wurde mit den Überexpressionslinien verfahren. Aus der cDNS der Linien *sc/8-1* bis *sc/8-3* ließ sich kein Produkt amplifizieren (Abb. 25), was bedeutet, dass keine RNS mehr synthetisiert und somit auch davon ausgegangen werden konnte, dass kein Protein exprimiert wird.

Dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis des Nachweises der Insertion. In den Überexpressionslinien *35S::SCL8-1* und *-2* wurde erwartungsgemäß eine höhere Konzentration an cDNS synthetisiert als im Wildtyp Columbia (Abb. 25). Die entstandenen Amplifikate der Überexpressionslinien 1 und 2 sowie der Wildtyp Columbia hatten eine Größe von 1950 Bp (Abb. 25). Die transformierten Linien sind voneinander unabhängig, da sie jeweils aus unterschiedlichen Transformationsansätzen stammen. Als Kontrolle gleichmäßig eingesetzter cDNS wurde mithilfe der Oligonukleotide „Aktin f“ und „Aktin r“ das *AKTIN2* Gen amplifiziert.

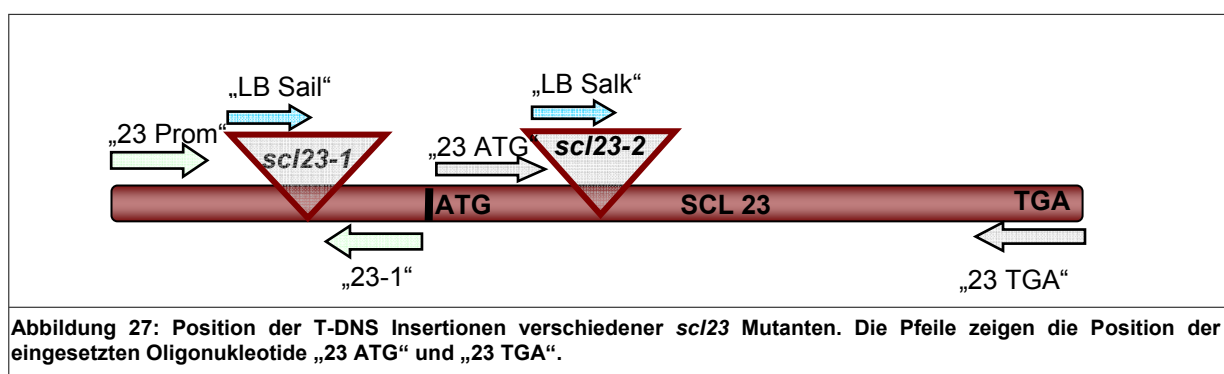


Die Insertionen der Linien *sc/8-1* und *sc/8-3* liegen sehr nahe am Stoppkodon (Abb. 24). Es war daher wichtig zu überprüfen, ob gegebenenfalls ein verkürztes Protein in diesen beiden Linien synthetisiert wird, da ein verkürztes Protein Einfluß auf den Phänotyp haben könnte. Im Falle des GRAS-Proteins PAT1 (Torres und Bolle, unveröffentlichte Daten) zeigte sich, dass ein solches verkürztes Protein stabiler sein kann als das Volllängenprotein (Abb. 26). Mittels RT-PCR wurde überprüft, ob die Mutante *sc/8-1* möglicherweise ein verkürztes Protein synthetisiert. Hierbei wurden die Oligonukleotide „8 373 f“ und „8 684 r“ eingesetzt, die sich stromaufwärts der Insertion befanden (Abb. 26). Mit Hilfe der cDNS der Linie *sc/8-1* konnte tatsächlich ein Amplifikat nachgewiesen werden. Die Mutante *sc/8-1* könnte trotz ihrer Insertion in der Lage sein, ein verkürztes Protein zu bilden. Bezüglich der Mutante *sc/8-3* konnte kein Amplifikat nachgewiesen werden (Abb. 26).



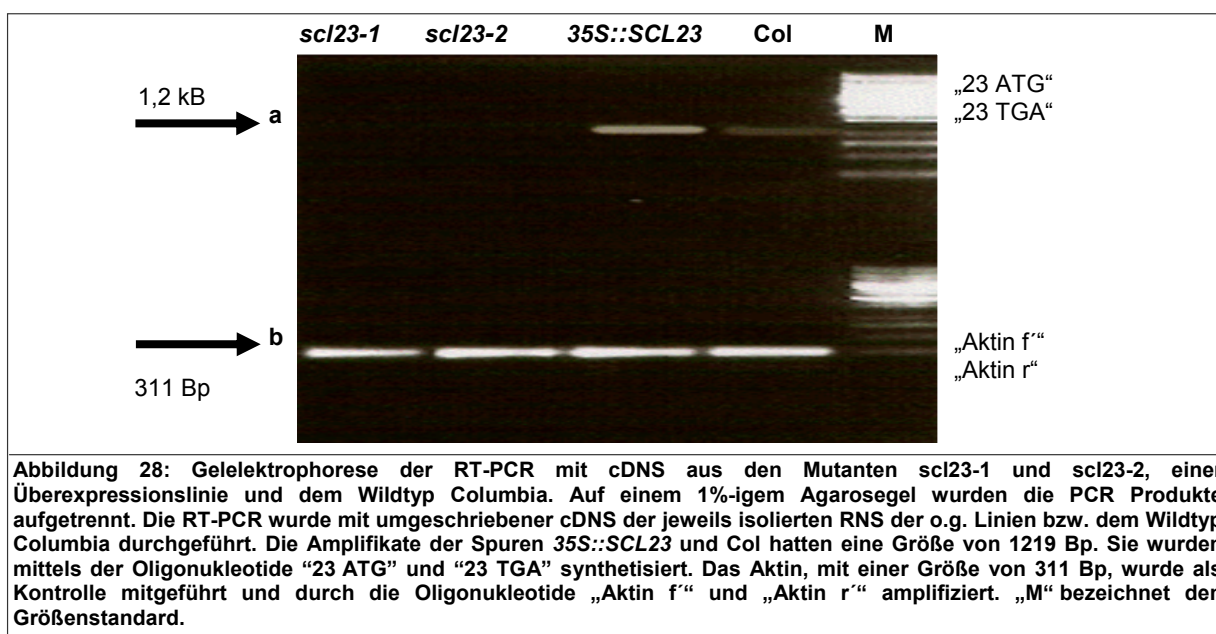
3.2.2.2 Nachweis der mRNA in *sc/23* und *35S::SCL23*

Für die Charakterisierung von SCL23 wurden zwei verschiedene Mutanten untersucht. Hierbei handelte es sich um die T-DNS Insertion *sc/23-1* (Sail 101_C01), deren Insertion sich 350 Bp vor dem ATG befindet. In der zweiten Linie, *sc/23-2* (SALK 039920) findet sich die Insertion 444 Bp nach dem ATG (Abb. 27). Die Linien *sc/23-1* und *sc/23-2* haben einen *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia Hintergrund. Die homozygoten Linien wurden durch Nachweis der mRNA bestätigt. Der Nachweis der mRNA in *sc/23-1* und *sc/23-2* Mutanten, sowie der Überexpressionslinie *35S::SCL23* und des Wildtyps Columbia wurde durch RT-PCR geführt. Die zu Beginn des Versuches isolierte RNS wurde, wie unter Abschnitt 6.4.1 beschrieben, mittels Reverser Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Mit Hilfe der Oligonukleotide „23 ATG“ und „23 TGA“ wurde die cDNS in einer PCR amplifiziert (Abb. 28).



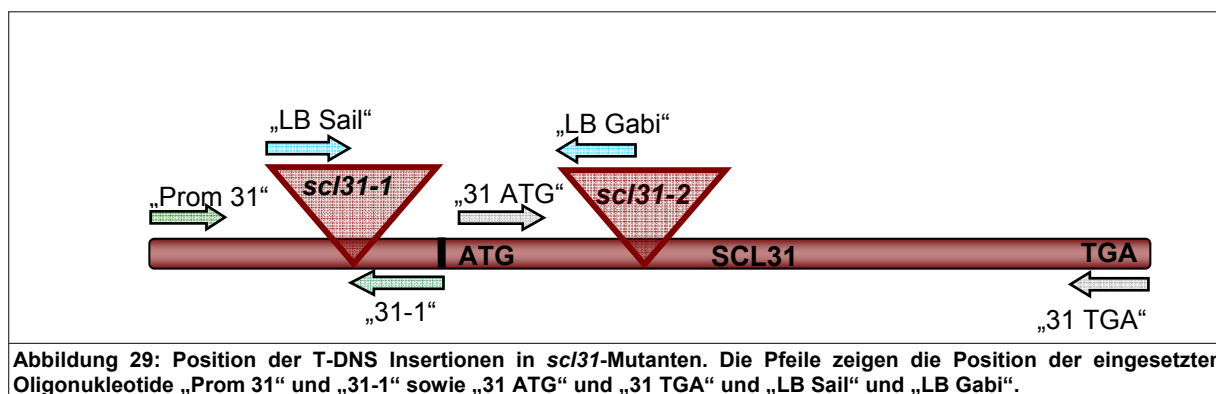
Die PCR-Reaktion (Abb. 28a) wurde mittels der Oligonukleotide „23 ATG“ und „23 TGA“ durchgeführt, die Kontrolle durch „Aktin f“ und „Aktin r“. Amplifikate der Linien *35S::SCL23* und Col zeigten eine Größe von 1219 Bp. Die Größe des Aktinamplikats hatte eine Größe von 311 Bp (Abb. 28b). Durch die semiquantitative PCR konnte gezeigt werden, dass die Mutanten *sc/23-1* und *sc/23-2* keine mRNA mehr synthetisieren (Abb. 28a).

Bezüglich der Linie *sc/23-1* war nicht zu erwarten, dass aus dieser PCR-Reaktion kein DNS-Fragment amplifiziert werden konnte, da die Insertion dieser Linie 350 Basenpaare vor dem ATG liegt. Vermutlich ist in der Mutante der regulatorische Bereich des Gens durch die Insertion beeinträchtigt. Ohne diese Region, stromaufwärts des Gens, kann die Synthese der mRNA nicht stattfinden. Für die Linie *35S::SCL23* konnte eine höhere Konzentration der cDNS nachgewiesen werden als im zu vergleichenden Wildtyp Columbia (Abb. 28a).



3.2.2.3 Nachweis homozygoter *sc/31* Mutanten

Für die Charakterisierung von *SCL31* wurden zwei Mutanten untersucht. In der Insertionslinie *sc/31-1* (Sail 1251_B08) befindet sich die Insertion 352 Bp vor dem Startkodon (=ATG) (Abb. 29). In der zweiten Linie, *sc/31-2* (GABI_KAT848H11) findet sich die Insertion 420 Bp nach dem ATG. Abbildung 29 zeigt die Position der Insertionen und der jeweiligen Oligonukleotide, die für diese PCR verwendet wurden.



Die Spuren 1-6 in Abb. 30 zeigten, dass die Linien 1-4 nur mit dem Oligonukleotid „LB-sail“, das homolog zur Grenzregion der Insertion zusammen mit dem gegenläufigen Oligonukleotid „31-1“ ein 575 Bp großes Amplifikat synthetisiert hat (Abb. 30). Mit dem Oligonukleotidpaar „Prom 31“ und „31-1“ wurde kein Fragment synthetisiert. Aus Spur 5 geht hervor, dass diese Pflanze homozygot bezüglich des Wildtypgens ist. Durch Amplifikate, die in Spur 6 aufgetragen wurden, konnte gezeigt werden, dass es sich hier um eine heterozygote Pflanze handelte. Durch beide Oligonukleotidpaare wurde ein Fragment synthetisiert (Abb. 30).

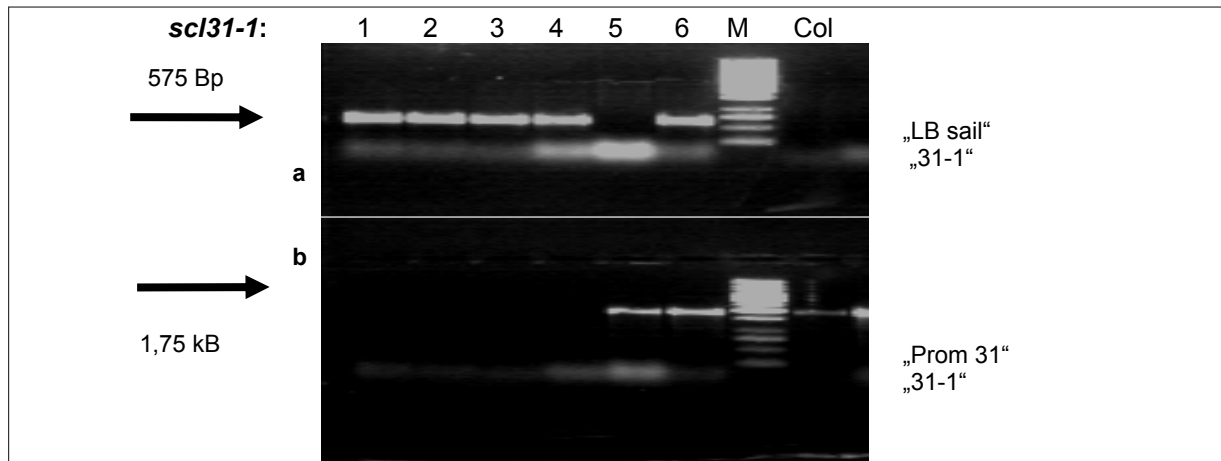
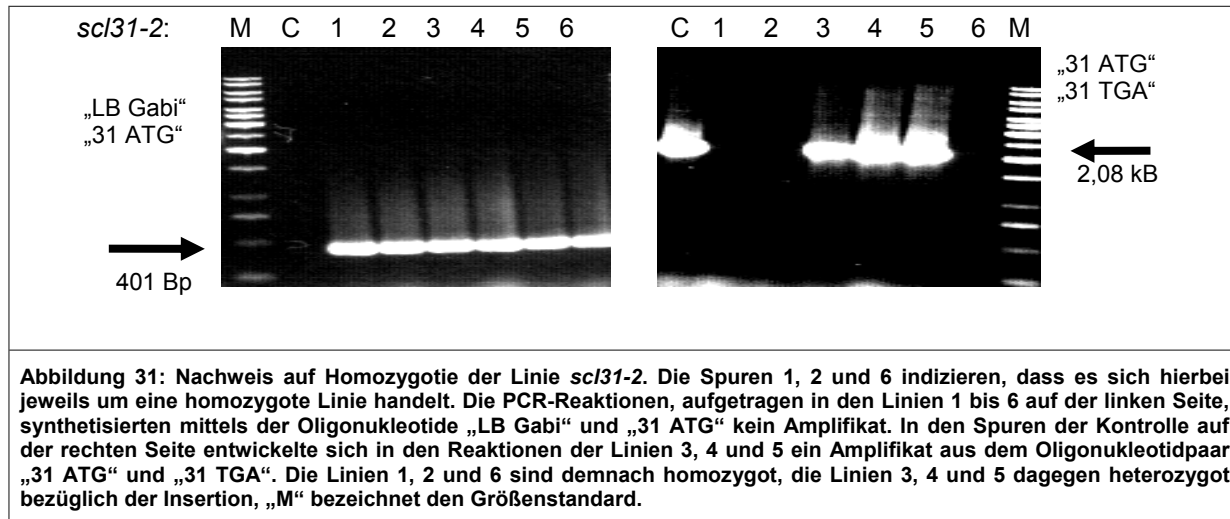


Abbildung 30: Nachweis der Homozygotie der Linie *sc/31-1*. In den Spuren 1-4 war jeweils das Amplifikat homozygoter Linien. In der oberen Reihe wurden die Oligonukleotide „LB Sail“ und „31-1“ verwendet. Das Produkt ist 575 Bp groß. In der unteren Reihe wurde die PCR-Reaktion mittels der Oligonukleotide „Prom 31“ und „31-1“ amplifiziert. Das Amplifikat in Spur 5, mit einer Größe von 1,75 Bp, deutet auf eine Wildtyppflanze hin, die Linie deren DNS in Spur 6 (1,75 Bp) zu sehen und ist heterozygot bezüglich der Insertion. Der Wildtyp Col zeigte nur mit den Oligonukleotiden „Prom 31“ und „31-1“ ein Amplifikat. „M“ bezeichnet den Größenstandard.

Nach gleicher Methode wurde mit den Mutanten der Linie *sc/31-2* verfahren. Die Linien 1 und 2 sind bezüglich ihrer Insertion homozygot. Die Spuren 3, 4 und 5 zeigen jeweils ein durch die Oligonukleotidpaare „31 ATG“ / „31 TGA“ und „31 ATG“ / „LB Gabi“ amplifiziertes 2080 Bp großes Fragment (Abb. 31). Sie sind somit als heterozygot bezüglich der Insertion identifiziert. In der ersten Spur befindet sich die DNS des Wildtyps Columbia. Hieraus wurde, wie erwartet, nur ein Fragment mit Hilfe des Oligonukleotidpaares „31 ATG“ und „31 TGA“ synthetisiert (Abb. 31).



3.3 Komplementation der Mutanten *sc/8*, 23 und 31

Komplementierte Mutanten können dafür herangezogen werden, Vergleichsstudien mit Mutanten, Überexpressionslinien und dem Wildtyp durchzuführen. Wird eine Mutante komplementiert, so entwickelt sich im Idealfall durch das wieder eingeführte Gen der Phänotyp des Wildtyps. Das jeweils durch T-Insertion zerstörte Gen wird durch eine Komplementation wieder ersetzt. *SCL8*, 23 und 31 wurden amplifiziert und in den „Gateway“-Vektor pK7FWG2 ligiert, wo es unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Blumenkohl-Mosaikvirus 35S-Promotors stand. Für die Komplementation wurde eine Plasmid-DNS konstruiert, die aus einem *GEN-GFP*-Fusions-Produkt besteht. Diese Konstruktion wurde durch Agrobakterien in die Mutanten transformiert. Auf diese Weise wurden die Linien *sc/8-1* und *sc/8-2* komplementiert. Komplementierte Pflanzen wurden phänotypisch analysiert. Es konnte kein Phänotyp nachgewiesen werden, der dem der *sc/8* Mutante entsprach. Der Phänotyp der komplementierten Pflanzen glich dem des Wildtyps. Auf gleiche Weise wurde mit den Mutanten der Linien *sc/23-1*, *sc/23-2* und *sc/31-1* verfahren.

Die Samen komplementierter Pflanzen wurden auf Selektionsmedium ausgebracht, das je nach Vektor, ein Basta- oder Kanamycin-Resistenzgen enthielt. Die Mutanten wurden zweimal in den Wildtyp Columbia zurückgekreuzt. So sollte ausgeschlossen werden, dass der Phänotyp gegebenenfalls von einer anderen Insertion in der Mutationslinie hervorgerufen wurde. Aufgrund der Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass die im Folgenden beschriebenen Phänotypen durch die jeweilige Mutation durch die T-DNS-Insertion hervorgerufen wurden.

3.4 Charakterisierung der Mutanten *sc/8*, -23 und -31 sowie der Überexpressionslinien 35S::*SCL8*, -23 und -31

Ein wichtiger Schritt auf dem Weg der Charakterisierung der GRAS-Proteine SCL8, 23 und 31 war, neben der Analyse der Mutanten, die Effekte der Überexpressionslinien der entsprechenden Gene zu untersuchen. Als Selektionsmarker der transformierten Linien diente Kanamycin bzw. Basta. Die phänotypische Analyse der Überexpressionslinien wird im Folgenden jeweils im Zusammenhang mit den jeweiligen Mutanten beschrieben. Auf Grundlage der Expressionsmuster-Analysen wurden zur weiteren Charakterisierung die phänotypischen Merkmale von *sc/8*, -23 und -31 untersucht. Durch die Ergebnisse aus den Datenbankrecherchen der Microarray-Daten wurden verschiedenste physiologische Versuche mit den Mutanten und Überexpressionslinien durchgeführt, um die biologische Relevanz dieser Proteine weiter aufzuklären. Die Linien wurden jeweils auf Erde ausgebracht und unter Weißlicht bis zu zehn Wochen im Gewächshaus angezogen, um gegebenenfalls einen morphologischen Phänotyp zu detektieren.

3.4.1 Charakterisierung der *sc/8* Mutanten und der Überexpressionslinie 35S::*SCL8*

3.4.1.1 Keimlinge der *sc/8* Mutanten

Hierfür wurden sterilisierte Samen auf ½-MS-Medium ausgebracht und zunächst für fünf Tage unter Weißlicht gehalten. Die darauf entwickelten Keimlinge sollten für phänotypische Untersuchungen auf andere Petrischalen umgesetzt werden. Dabei stellte sich heraus, dass sich unter den „normal“ entwickelten Pflänzchen Keimlinge entwickelten, die in ihrem Wachstum gehemmt waren (Abb. 32a-b). Die wachstumsreduzierten Keimlinge entwickelten ein Hypokotyl und zwei Kotyledonen (Abb. 32c). Eine Wurzel konnte auch unter dem Mikroskop nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Es konnte unter dem Mikroskop nur eine komprimierte Zellstruktur nachgewiesen werden. Die wachstumsdefizienten Keimlinge scheinen weder apikal noch in der Wurzel Meristeme zu entwickeln (Abb. 32c,d), aus denen heraus sich die Pflanze weiter entwickeln konnte. Weitere Versuche wie zum Beispiel elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten klären, ob sich tatsächlich keine Meristeme bildeten oder die Meristeme in einem sehr jungen Stadium ihre Entwicklung eingestellt haben.

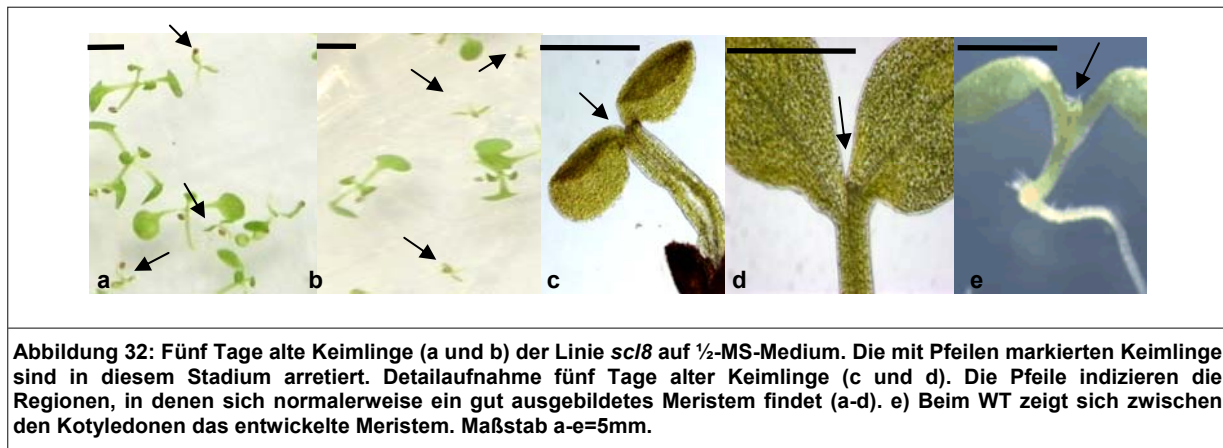


Abbildung 32: Fünf Tage alte Keimlinge (a und b) der Linie *scI8* auf $\frac{1}{2}$ -MS-Medium. Die mit Pfeilen markierten Keimlinge sind in diesem Stadium arretiert. Detailaufnahme fünf Tage alter Keimlinge (c und d). Die Pfeile indizieren die Regionen, in denen sich normalerweise ein gut ausgebildetes Meristem findet (a-d). e) Beim WT zeigt sich zwischen den Kotyledonen das entwickelte Meristem. Maßstab a-e=5mm.

Das Diagramm (Abb. 33) zeigt, dass die Anzahl dieser sehr kleinen Keimlinge unter den *scI8* Mutanten zwischen 30% (*scI8-2*) und 55% (*scI8-1*) lagen. Hingegen fanden sich bei den Wildtypen Columbia etwa 2,25% und bei Landsberg 19,2% der wachstumsdefizienten Keimlinge (Abb. 33). Bei den Überexpressionslinien waren 2,1% nicht mehr in der Lage weiter zu wachsen.

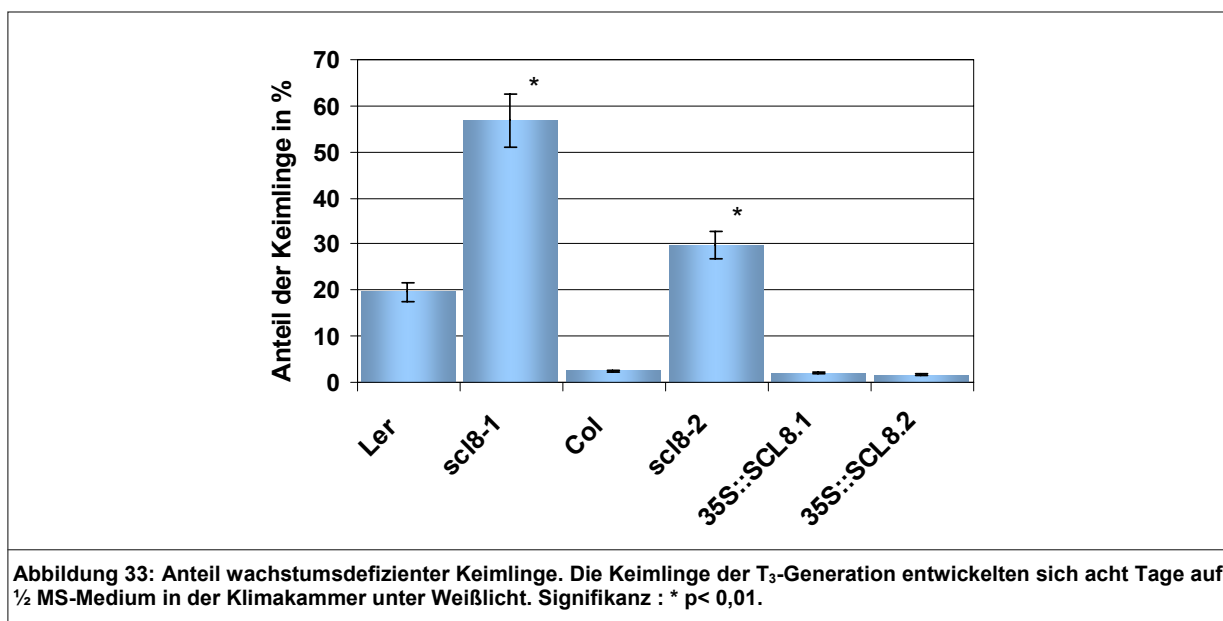


Abbildung 33: Anteil wachstumsdefizienter Keimlinge. Die Keimlinge der T_3 -Generation entwickelten sich acht Tage auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium in der Klimakammer unter Weißlicht. Signifikanz : * $p < 0,01$.

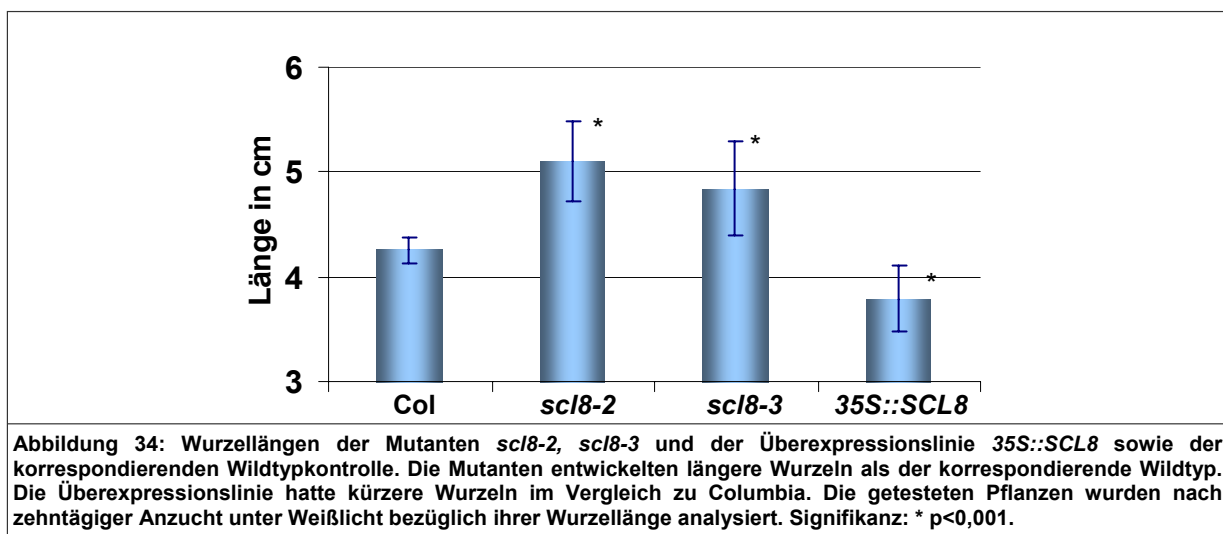
3.4.1.2 Wurzelphänotyp der *scI8* Mutanten

Die Expressionsmuster der GUS-Versuche und der Microarray-Daten-Analyse ließen vermuten, dass das Protein SCL8 möglicherweise an der Regulation meristematischer Gewebe in den oberirdischen Organen der Pflanze beteiligt sind. Doch wie sieht es mit den meristematischen Geweben der Wurzel aus? Zur Beantwortung dieser Frage wurden die *scI8* Mutanten auf ihre Wurzelentwicklung hin untersucht. Sofern in der Wurzel eine Beeinträchtigung der Meristementwicklung stattfindet, würde sich vermutlich ein Wurzelphänotyp nachweisen lassen. Die meristematischen Zellen des RAM in der Wurzel sind wichtig für das weitere Wachstum der Wurzel während Seitenwurzeln ihren Ursprung in den Perizykelzellen haben.

Veränderungen in diesen Geweben haben entscheidenden Einfluss auf die Wurzelentwicklung. Die Wurzeln der *sc/8* Mutanten wurden durch Analyse zweier Parameter charakterisiert: Zum Einen wurde die Länge der Primärwurzel (Abb. 34) gemessen und zum Anderen die Anzahl der Seitenwurzeln ermittelt (Abb. 35). Die Samen wurden hierfür zunächst auf ½-MS-Medium mit 0,8% Agar unter Weißlicht angezogen und im Alter von zwei Tagen auf ½-MS-Medium, mit 1,2%-igem Agar, umgesetzt. Die Petrischalen wurden vertikal für acht Tage, unter Weißlicht in die Klimakammer gestellt. Durch den harten Agar und die vertikale Ausrichtung der Petrischalen konnten die Wurzeln auf dem Agar nach unten wachsen und am Ende des Versuchs leicht dokumentiert werden.

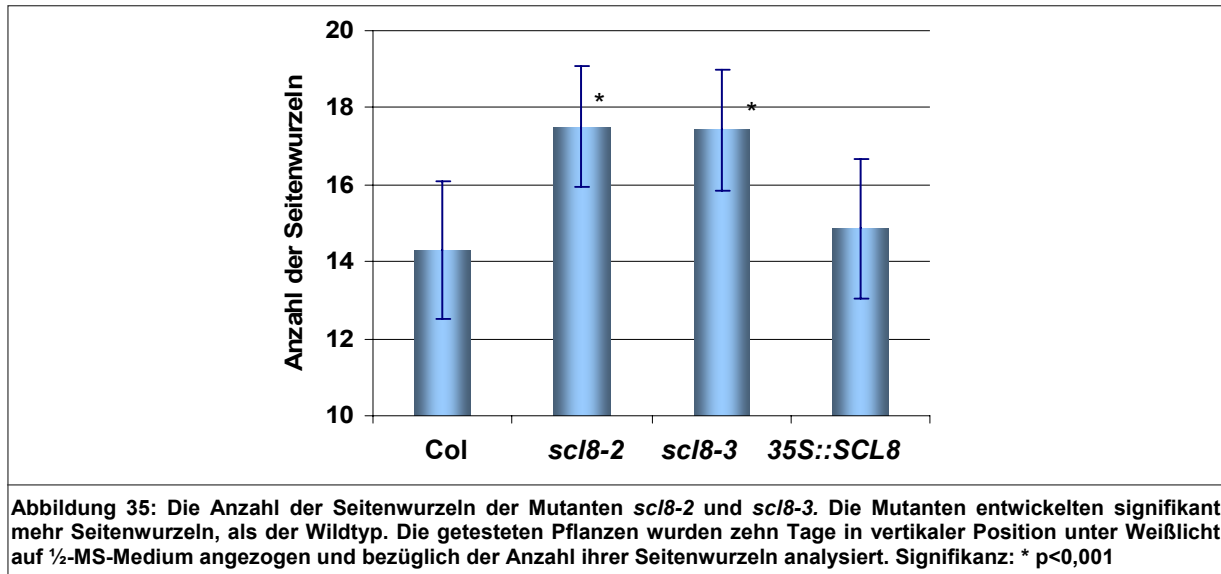
3.4.1.3 Länge der Primärwurzeln

Zunächst wurde eine Längenmessung der Primärwurzel durchgeführt. Für dieses Experiment wurden die Keimlinge zehn Tage auf den vertikal stehenden Petrischalen in der Klimakammer unter Weißlicht kultiviert. Die Primärwurzeln der Mutanten waren signifikant länger als die des Wildtyps Columbia. Die Überexpressionslinie entwickelte kürzere Wurzeln gegenüber der Kontrolle (Abb. 34).



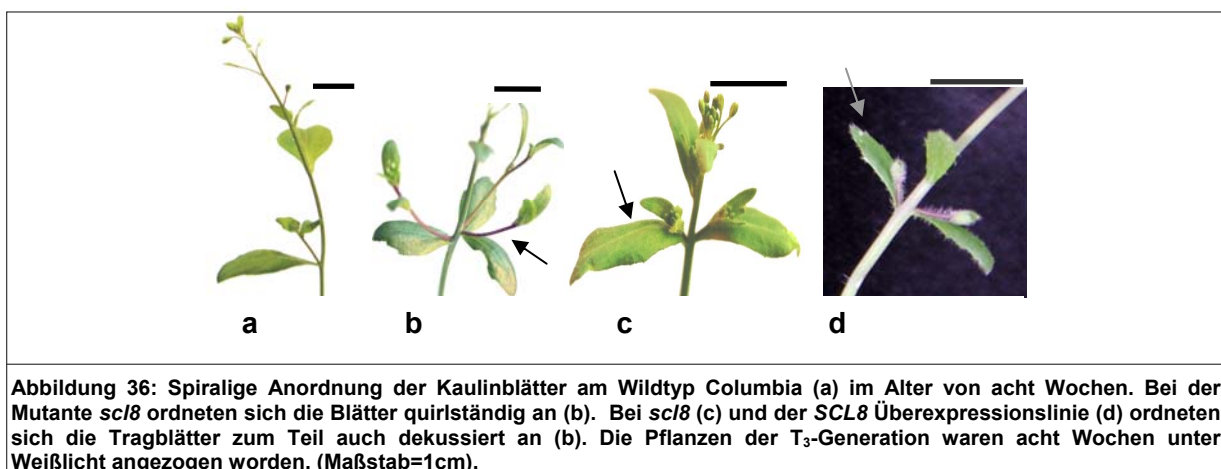
3.4.1.4 Anzahl der Lateralwurzeln

Wildtyppflanzen beginnen etwa zehn Tage nach ihrer Keimung Lateralwurzeln zu entwickeln (Schiefelbein et al. 1997, Berger et al. 1998). Für diesen Versuch wurden die Pflanzen auf ½-MS-Medium unter Weißlicht angezogen und nach zehn Tagen die Anzahl der entwickelten Seitenwurzeln ausgewertet. Die Mutanten *sc/8-1* und *sc/8-2* entwickelten mehr Seitenwurzeln als der Wildtyp (Abb. 35).

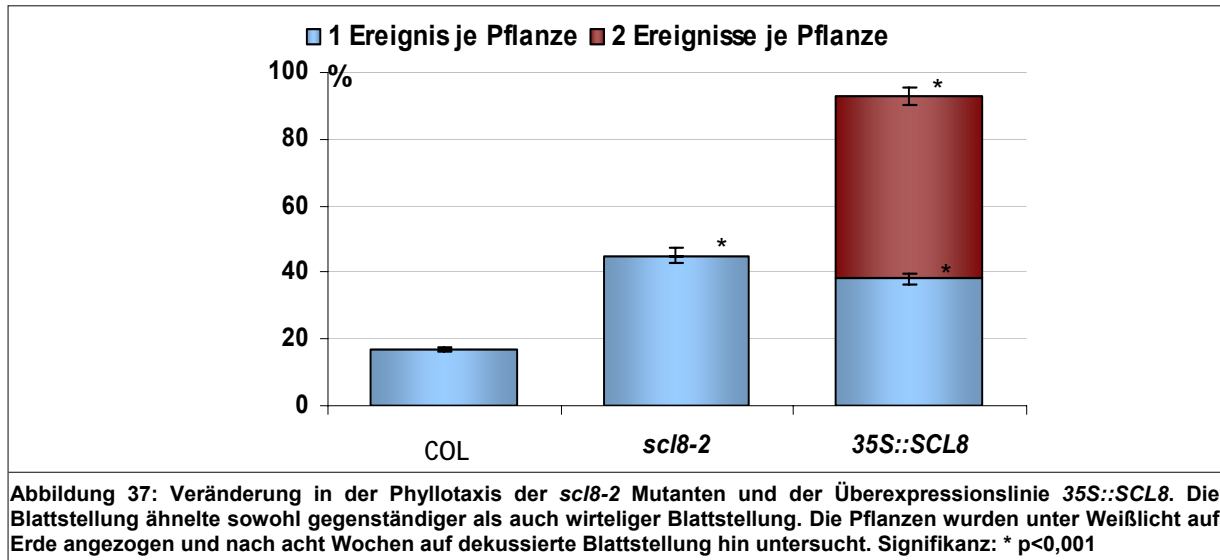


3.4.1.5 Veränderungen der Phyllotaxis bei *scl8* und *35S::SCL8*

Neben phänotypischen Untersuchungen auf Gewebekultur, war es auch wichtig, die Pflanzen bezüglich ihrer Morphologie zu analysieren. Die Samen der Linien wurden auf Erde ausgesät und alle zwei Tage bezüglich ihres Phänotyps analysiert. Die Entwicklung der Linien *scl8* und *35S::SCL8* auf Erde unterschied sich in den ersten sechs Wochen nicht von der Wildtypkontrolle Columbia. Acht Wochen nach Keimung fanden sich mehrere morphologische Phänotypen. Während der Wildtyp einer spiraligen Blattanordnung folgt (Abb. 36a), zeigte sich sowohl in der Überexpressionslinie (Abb. 36d), als auch in den Mutanten (Abb. 36b) eine gegenständige Blattform. In seltenen Fällen konnte auch eine nahezu quirlständige (=mehr als 2 Blätter auf gleicher Höhe am Spross) Anordnung nachgewiesen werden (Abb. 36c).

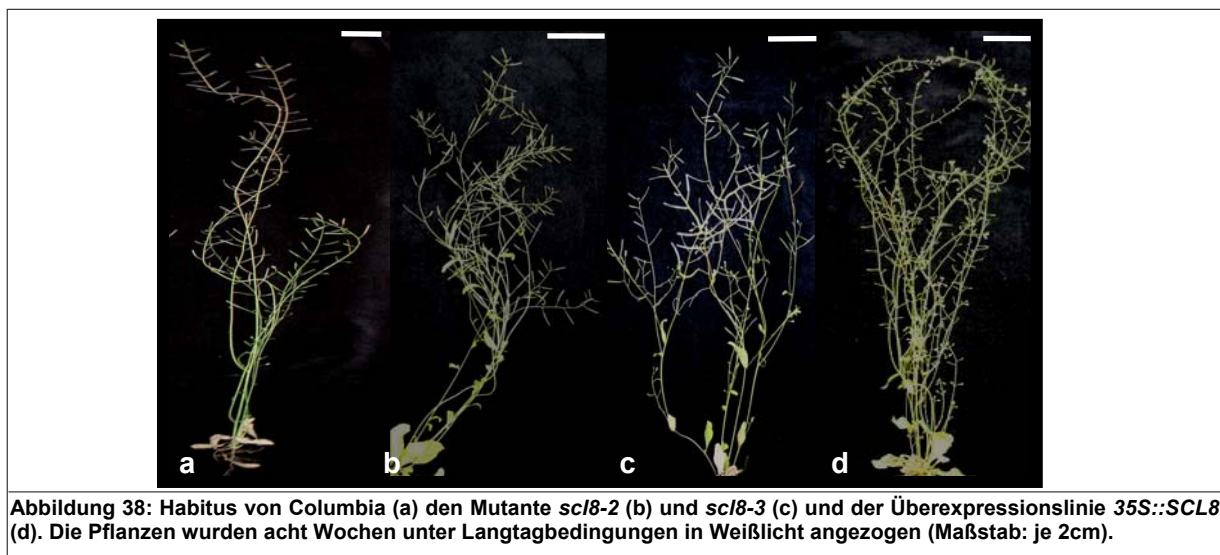


Aus der Grafik in Abbildung 37 geht hervor, dass die dekussierte Blattabfolge bei der Überexpressionslinie wesentlich häufiger in Erscheinung trat als bei der Mutante. Dieses Ereignis konnte bis zu zwei Mal pro Pflanze beobachtet werden.

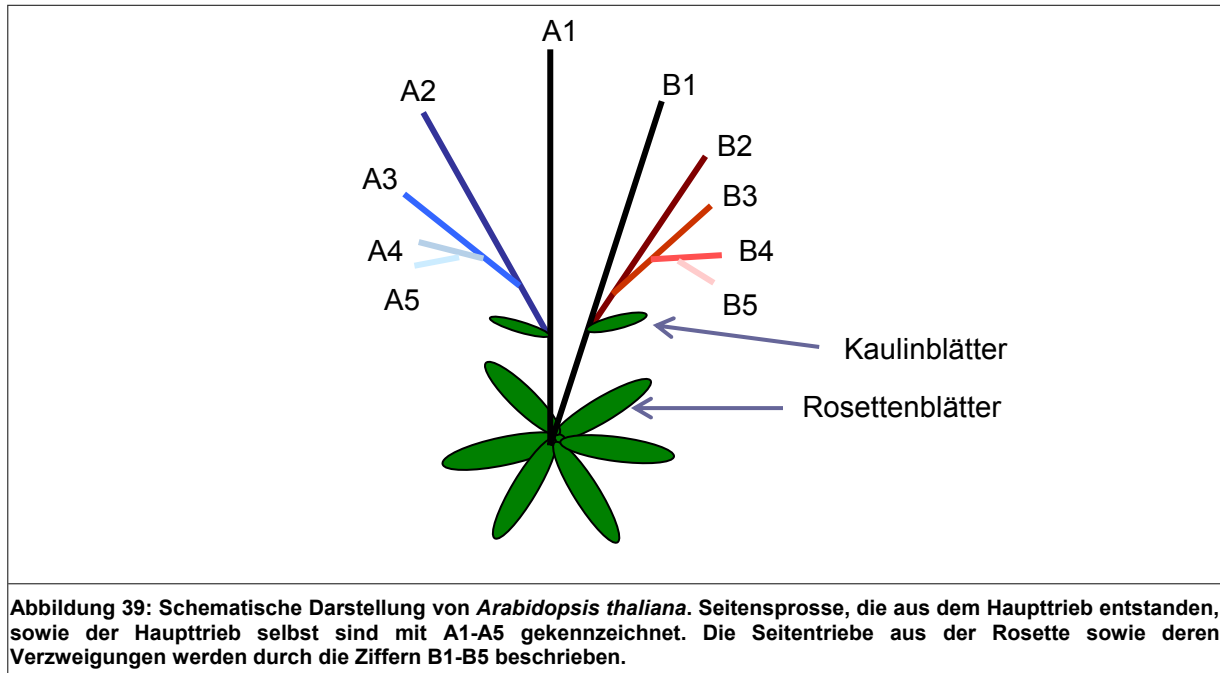


3.4.1.6 Erhöhte Anzahl von Seitentrieben in *scI8* und *35S::SCL8*

Wildtyppflanzen des Ökotyps Columbia bilden nach der Elongation ihres Hauptsprosses im Durchschnitt bis zu vier Seitentriebe aus der Rosette (A) und vier Seitentriebe aus dem Hauptspross aus. Die Pflanzen der Linien *scI8-2*, *scI8-3*, *35S::SCL8* und die Wildtypkontrolle waren für acht Wochen im Gewächshaus unter Langtagbedingungen beobachtet und ihre Entwicklung quantifiziert worden. Sowohl die Mutanten *scI8-2* und *scI8-3* als auch die Überexpressionslinie waren deutlich buschiger gewachsen als der Wildtyp (Abb. 38).

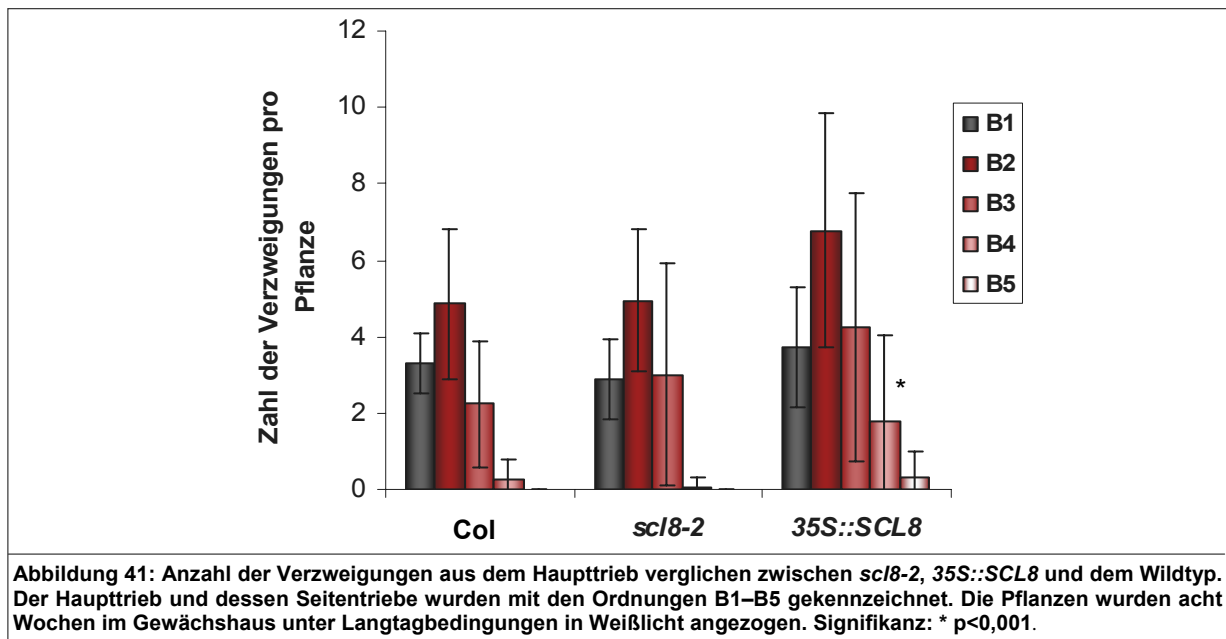
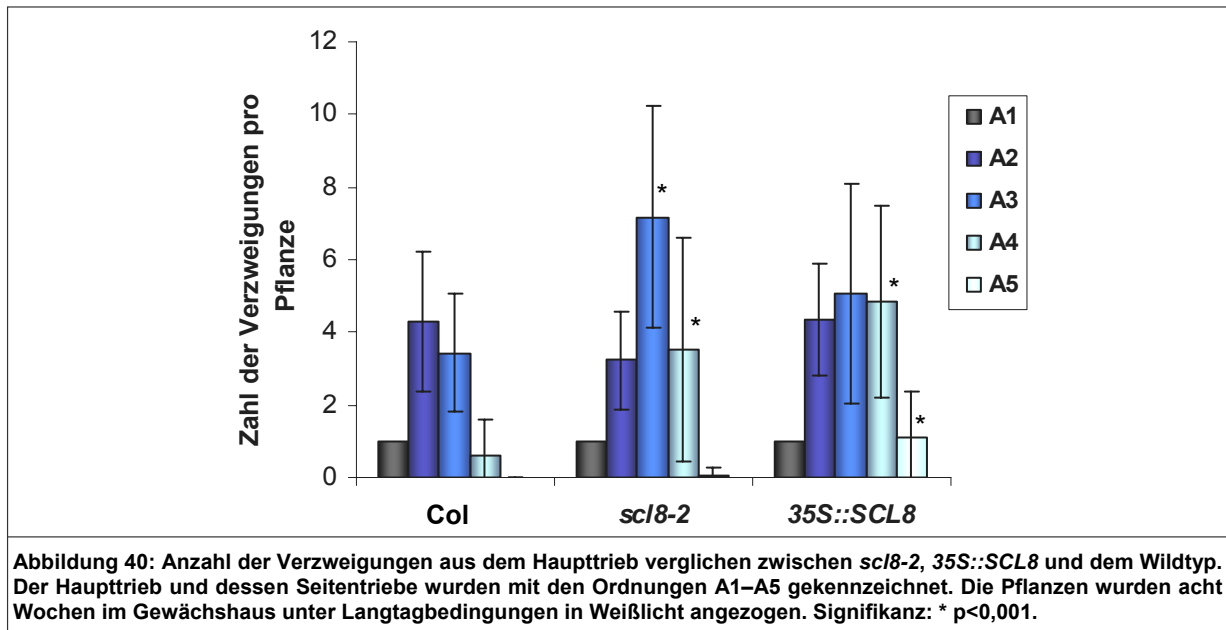


Für eine differenzierte Erfassung der Seitentriebe wurde zunächst ein Schema entwickelt, dass die einzelnen Seitentriebe durch Zahlen und Buchstaben benennt. Der Hauptspross sowie seine Verzweigungen wurden mit den Nummern A1 - A5 beschrieben (Abb. 39). Die Seitentriebe, die sich direkt aus der Rosette entwickelten sowie deren Verzweigungen wurden mit den Ziffern B1 – B5 belegt (Abb. 39).

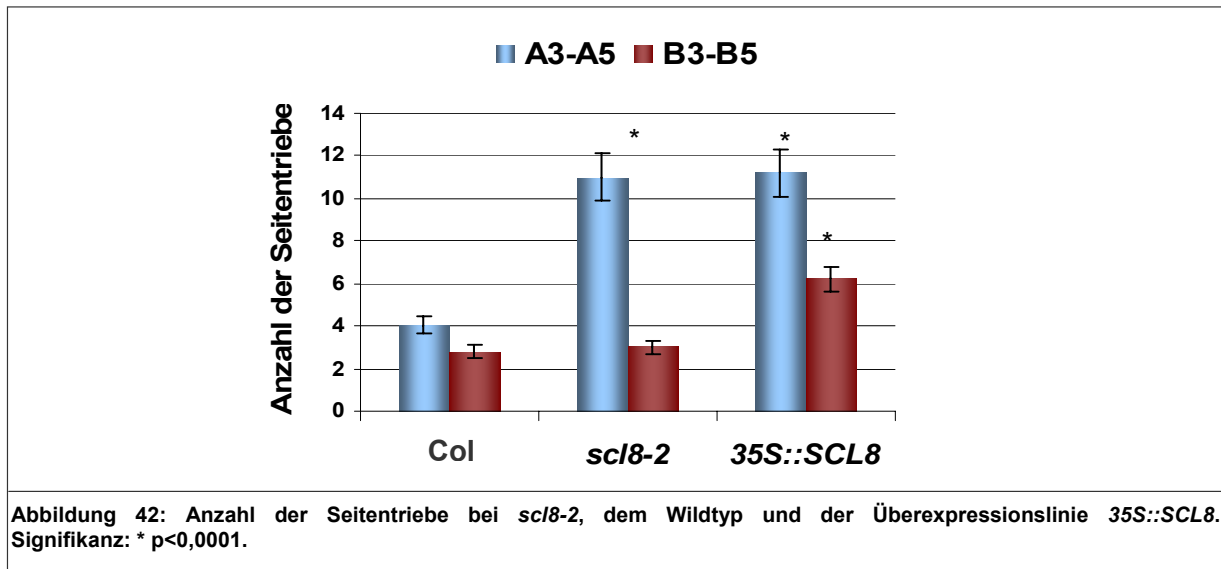


Hinsichtlich der Verzweigungen der Seitentriebe aus der Rosette (B) konnte in der Überexpressionslinie eine signifikante Erhöhung der B4 Seitensprosse nachgewiesen werden (Abb. 41). Zudem entwickelten die Überexpressionslinien in seltenen Fällen auch Seitentriebe der Ordnung A5 und B5, welche sich im Wildtyp in der Regel nicht entwickelten (Abb. 40 und 41). Die Anzahl der Seitentriebe aus dem Haupttrieb A1 war in den Überexpressionspflanzen zwar erhöht, jedoch nicht signifikant (Abb. 40).

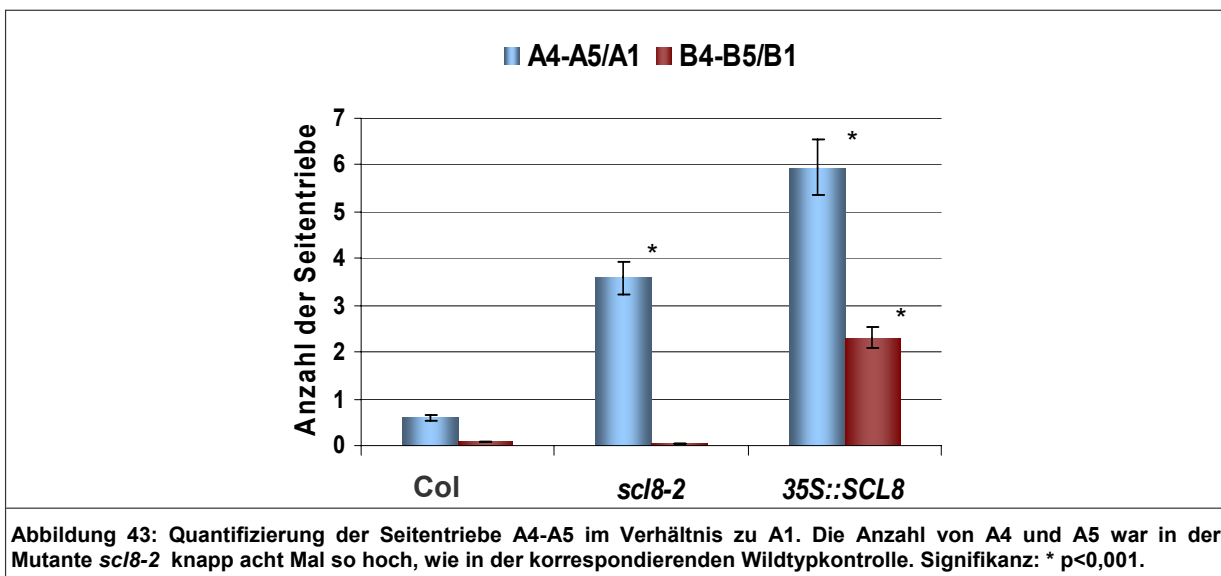
Die Zahl der Seitentriebe der Ordnung A3 war in der Mutante signifikant und etwa doppelt so hoch wie im Wildtyp. Bezüglich der Überexpressionslinie konnte keine signifikante Erhöhung nachgewiesen werden (Abb. 40). Betrachtet man die Anzahl der A2 Seitentriebe in den Mutanten, so wird klar, dass die Anzahl dieser Seitentriebe etwas reduziert ist. Das Verhältnis verschiebt sich hier zugunsten der Seitentriebe A3 und A4 (Abb. 40). Ursache für den Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Pflanzen der *sc/8-2* Mutante ist die Zunahme der Seitensprosse A3 und A4 (Abb. 40).



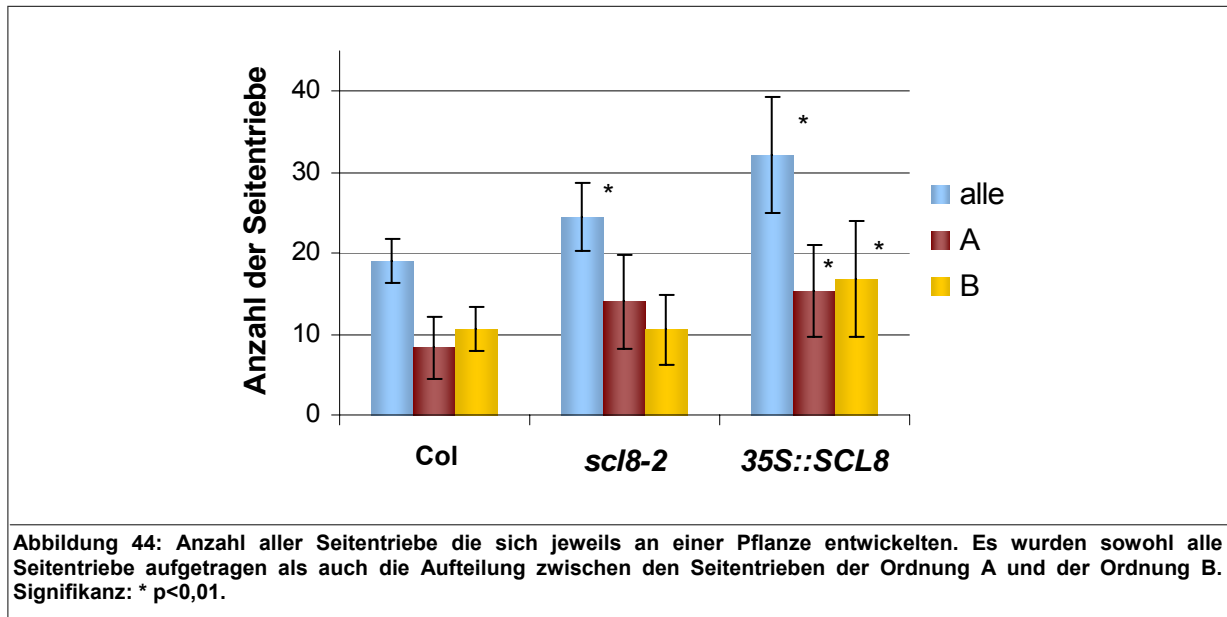
Addiert man die Anzahl der Seitentriebe A3 und A5 wird deutlich, dass sowohl die Mutante *scl8-2* als auch die Überexpressionslinie *35S::SCL8* signifikant mehr Sprosse aus dem Haupttrieb entwickeln und die Überexpressionslinie zusätzlich auch mehr Seitensprosse aus der Rosette entwickelt (Abb. 42).



Die Seitentriebe A4-A5 und B4-B5 wurden ins Verhältnis zu A1 bzw. B1 gesetzt, so ergab sich die Zahl der Seitentriebe, die sich jeweils auf eine Infloreszenz A1 bzw. B1 verteilen. Die Anzahl der Seitentriebe A4-A5 der Linie *35S::SCL8* waren im Vergleich zum Wildtyp um das zwölffache erhöht (Abb. 43). Gleichzeitig zeigte sich, dass die Anzahl der Seitentriebe B4-B5 um das 10-fache erhöht war, verglichen zum Wildtyp (Abb. 43).

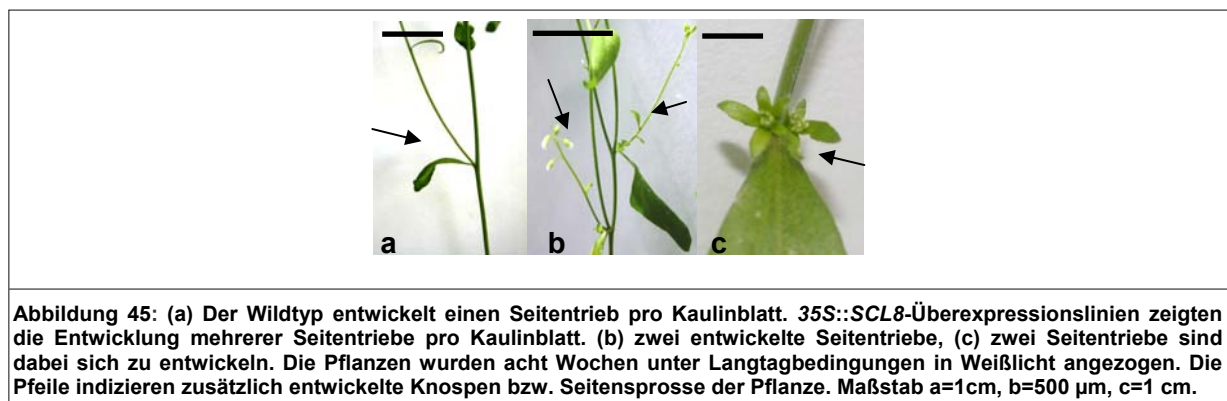


Insgesamt zeigte sich eine 1,7-fache Erhöhung aller Seitensprosse der Überexpressionslinie und eine 1,4-fache Erhöhung aller Seitensprosse der Linie *scl8-2*. Die Erhöhung ist bei Addition aller Seitentriebe aber nicht signifikant. Bei Aufteilung der Seitentriebe nach A und B erwies sich, dass sowohl *scl8-2* als auch die Überexpressionslinie signifikant mehr Verzweigungen der Ordnung A entwickelten (Abb. 44). Innerhalb der Ordnung B, entwickelte nur die Überexpressionslinie *35S::SCL8* signifikant mehr Seitensprosse (Abb. 44).

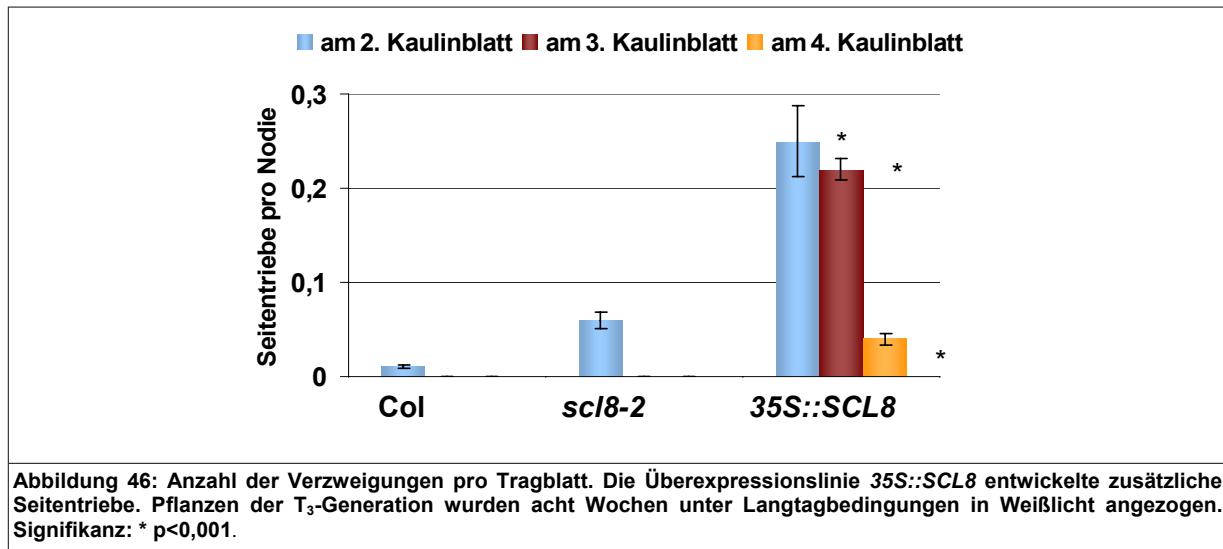


3.4.1.7 Verminderte Repression der Seitenmeristeme der Überexpressionslinie 35S::SCL8

In einer Wildtyppflanze werden normalerweise nach dem Auswachsen des ersten Apikalmeristems weitere Seitenmeristeme durch die endogene Auxinkonzentration der Pflanze unterdrückt. In der Regel wächst ein Seitentrieb aus der Achsel eines Tragblattes (Abb. 45a). Im Falle der 35S::SCL8 Überexpressionslinie greift dieses Kontrollsystem der Repression der Seitenmeristeme durch Auxin nicht und es kommt zur Bildung weiterer Seitentriebe aus einem einzigen Kaulinblatt (Abb. 45b-c). Die Überexpressionslinie 35S::SCL8 entwickelte nach acht Wochen in den Achseln der Kaulinblätter einen zweiten (Abb. 45b-c), in seltenen Fällen sogar einen dritten Seitenspross.



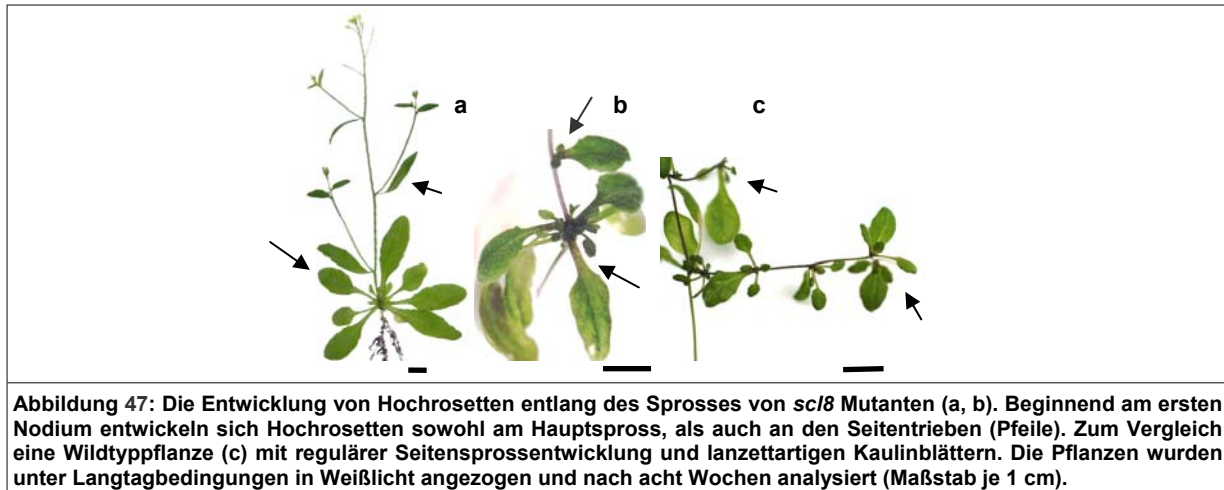
Die Entwicklung zusätzlicher Knospen bzw. Seitentriebe war vom untersten Kaulinblatt in Richtung apikal zu verfolgen. Die Grafik in Abb. 46 zeigt die Anzahl dieser entwickelten Knospen pro Nodium, umgerechnet auf die Gesamtzahl der Nodien einer Pflanze.



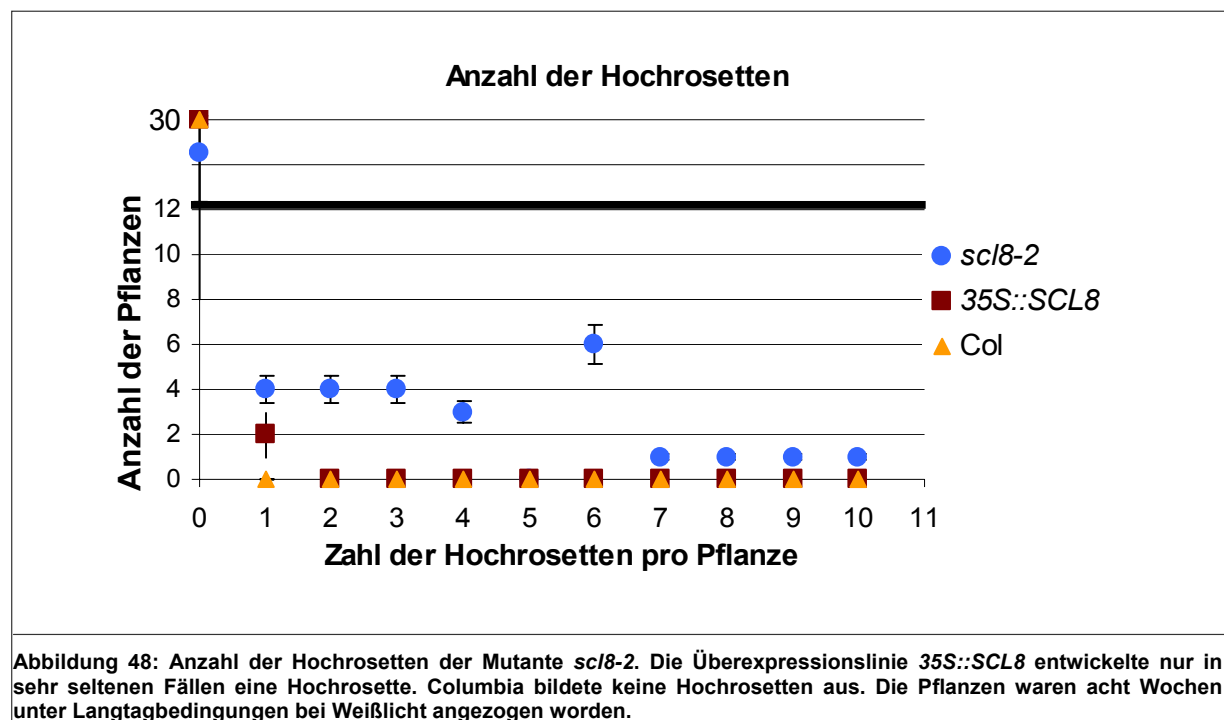
3.4.1.8 Entwicklung von Hochrosetten an Pflanzen der *scI8-2* Mutante

Höhere Pflanzen durchlaufen während ihres Lebens verschiedene Wachstumsphasen. Der Wechsel von der vegetativen zur reproduktiven Phase ist dabei wohl die dramatischste Veränderung (Araki et al. 2001). Solange eine Pflanze nach Entwicklung des Hypokotyls Rosettenblätter entwickelt befindet sich die Pflanze in der vegetativen Phase. In der darauf folgenden reproduktiven Phase beginnt das apikale Sprossmeristem die Produktion der Rosettenblätter einzustellen und beginnt aus den Achseln der Kaulinblätter und Blüten mit verlängerten Internodien zu entwickeln (Roe et al. 1993, Suh et al. 2003). In der Regel entwickelt *Arabidopsis thaliana* an den ersten Internodien des Hauptsprosses die Tragblätter (=Kaulinblätter). Sie treten jeweils einzeln auf und aus ihren Achseln gehen neue Seitentriebe und Blüte hervor. Im Zusammenhang mit der Transition zeigte die Mutante *scI8-2* einen bemerkenswerten Phänotyp. Entsprechend der korrespondierenden Wildtypkontrolle entwickelte die *scI8-2* Mutante zunächst eine Rosette aus der ein Hauptspross hervorging. Nach der Elongation dieser Hauptachse entwickelte sich auch ein Tragblatt, entsprechend dem Wildtyp Columbia. Bevor aus der Achsel dieses Tragblattes ein Seitenspross in Erscheinung trat, entwickelte sich eine Anzahl von Rosettenblättern an diesem Tragblatt und bildeten eine Hochrosette aus (Abb. 47b,c).

Bemerkenswert ist, dass die Mutanten scheinbar in die bereits abgeschlossene vegetative Entwicklungsphase zurückkehrten. Aus den Hochrosetten entwickelt sich später noch ein Spross, der auch in der Lage ist Blüten zu bilden, entsprechend der Entwicklung einer regulären Bodenrosette (Abb. 47 b,c). An einzelnen Pflanzen der Mutante *scI8-2* konnten bis zu zehn Hochrosetten nachgewiesen werden. An der Überexpressionslinie kam in diesem Zeitraum nur eine einzige Hochrosette zur Entwicklung. Der Wildtyp Columbia bildete keine Hochrosetten aus (Abb. 47a). Bevorzugt entwickelten sich diese Hochrosetten zunächst am ersten Kaulinblatt. Diese Entwicklung setzte sich in apikaler Richtung fort.



In Abbildung 48 wird die Entwicklung der Hochrosetten schematisch dargestellt. Bei diesem Versuch war es wichtig festzustellen, ob es sich bei der Vielzahl von Blättern um Kaulin- oder Rosettenblättern handelte. Das erste Kriterium zur Unterscheidung waren die Trichome (=Brennhaare), die sich bei Kaulinblättern jeweils an der Unter- und Oberseite des Blattes befinden. Bei Rosettenblättern entwickeln sich Trichome nur auf der Oberseite des Blattes. Das zweite Unterscheidungskriterium war die Form der Blätter. Kaulinblätter sind lanzettartig (Abb. 47a), Rosettenblätter entwickeln eine eher abgerundete Blattform (Abb. 48a).



3.4.1.9 Bildung partieller Hochrosetten in der Überexpressionslinie *35S::SCL8*

Neben den bereits beschriebenen voll entwickelten Hochrosetten konnten auch partielle Hochrosetten nachgewiesen werden, die aus zwei oder drei Blättern zusammengesetzt waren. Die Entwicklung der partiellen Hochrosetten ist in Abbildung 49b dargestellt. Der Wildtyp bildete keine Rosettenblätter an den Kaulinblättern aus (Abb. 49a).

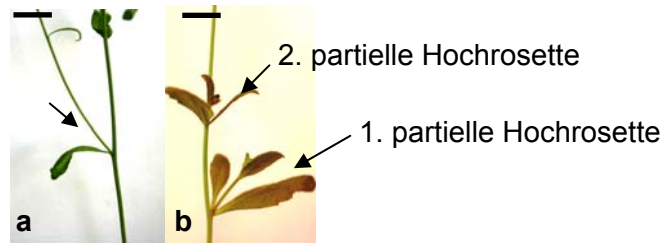


Abbildung 49: Entwicklung von Rosettenblättern an den Blattnodien der Überexpressionslinien 35S::SCL8. An zwei Internodien haben sich zum jeweiligen Tragblatt jeweils zwei zusätzliche Rosettenblätter entwickelt. Die Pflanzen der T₃-Generation wurden acht Wochen unter Weißlicht angezogen und danach analysiert. Maßstab=1 cm.

3.4.1.10 Veränderter Blühzeitpunkt der Linien *sc18* und 35S::SCL8

Wildtyppflanzen beginnen unter Langtagbedingungen im Durchschnitt nach 30 bis 35 Tagen zu blühen. Für die Ermittlung des Blühzeitpunkts wurden Samen auf Erde ausgesät und die Tage zwischen der Aussaat und der Entwicklung der Knospen gezählt. Dabei wurde deutlich, dass die Mutanten *sc18-1* und *sc18-2* wesentlich langsamer blühten als der korrespondierende Wildtyp. Der Unterschied lag jeweils bei sechs bis acht Tagen (Abb. 50). Die Messung des Blühzeitpunktes ist nicht nur durch die Anzahl der Tage bis zur Blüte messbar. Eine zweite Methode ist die Zählung der Rosettenblätter (Abb. 50), da die Pflanze bald nach dem Wechsel in die reproduktive Phase die Ausbildung der Rosettenblätter einstellt. Die Zählung der Rosettenblätter bestätigte die Ergebnisse des Blühzeitversuchs in Tagen (Abb. 50). Die Mutanten sind in ihrer Blühzeit signifikant verzögert. Die Überexpressionslinie entwickelte einen signifikant verzögerten Blühzeitpunkt bezüglich der Anzahl der Tage bis zur Blüte. Die Zahl der Rosettenblätter war bei den Mutanten *sc18-2* und *sc18-3* leicht erhöht. Es konnte diesbezüglich keine Signifikanz ermittelt werden.

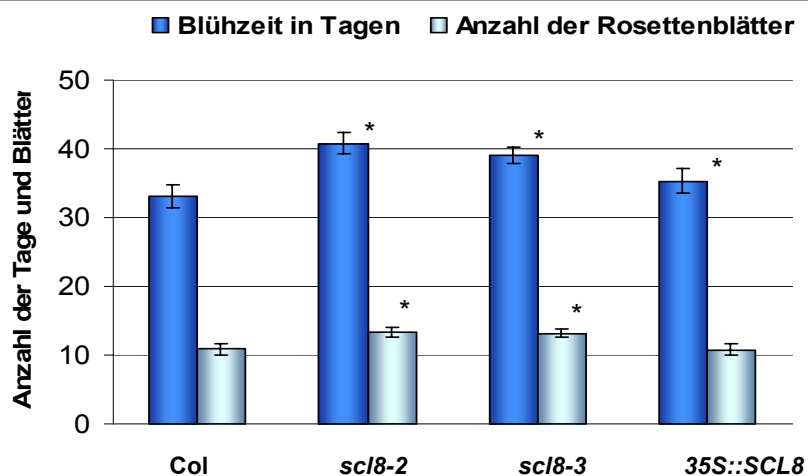
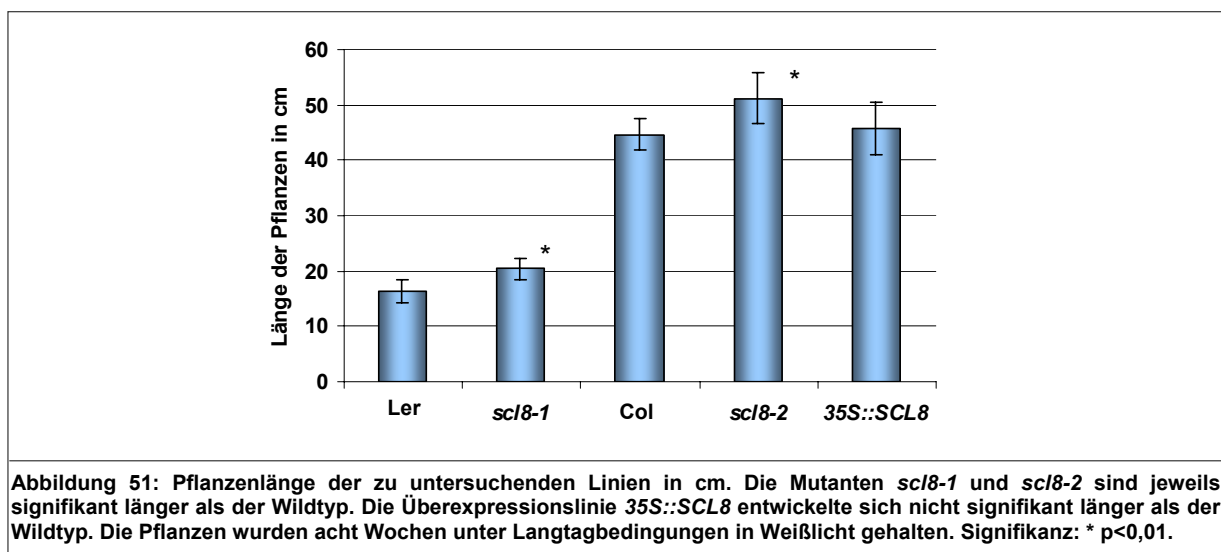


Abbildung 50: Vergleich der Blühzeit in Tagen zwischen den Mutanten *sc18-2* und *sc18-3*, der Überexpressionslinie 35S::SCL8 sowie dem Wildtyp Columbia. Mutanten *sc18-2* und *sc18-3* haben einen signifikant verspäteten Blühzeitpunkt gegenüber dem jeweils vergleichbaren Wildtyp. Die Überexpressionslinie ist nur bezüglich der Blühzeit in Tagen signifikant verzögert. Bezüglich der Anzahl der Rosettenblätter entspricht diese Entwicklung dem des Wildtyps. Signifikanz: * $p < 0,001$

3.4.1.11 Länge der Pflanzen

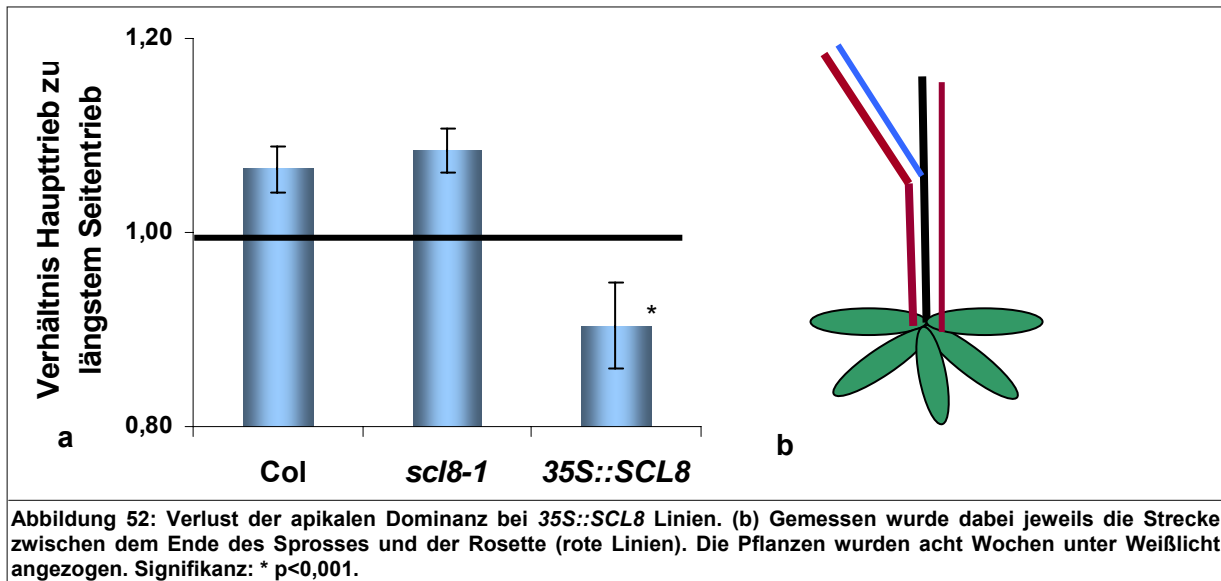
Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Gesamtlänge der Pflanzen der einzelnen Linien untersucht. Die Pflanzen entwickelten sich acht Wochen unter Langtagbedingungen in Weißlicht und wurden dann vermessen (Abb. 51). Hierzu wurde die Distanz zwischen der Bodenrosette und der terminierenden Blüte gemessen. Vergleicht man die Länge des Hauptsprosses der Linien der Mutanten *scf8-1* (20,4 cm, +/-,8 cm) und *scf8-2* (51,19 cm +/- 4,5 cm), so sind diese signifikant länger als der Wildtyp Landsberg (16,25 cm +/-2,137 cm) bzw. Columbia (44,7 cm +/- 2,8 cm) (Abb. 51). Die Überexpressionslinie *35S::SCL8* war mit durchschnittlich 45,7 cm Gesamtlänge (+/- 4,7 cm) hingegen nicht signifikant länger als die korrespondierende Wildtypkontrolle (Abb. 51).



3.4.1.12 Verlust apikaler Dominanz in der *35S::SCL8* Überexpressionslinie

In Wildtyppflanzen von *Arabidopsis thaliana* ist der Hauptspross einer Pflanze länger als die Seitensprosse. Das Ende des Hauptsprosses beschreibt den höchsten Punkt einer *Arabidopsis thaliana* Pflanze. Das Überwachsen der Seitensprosse durch den Hauptspross bezeichnet man als apikale Dominanz. In der Regel stimulieren Auxine das Streckungswachstum des Haupttriebs. Gleichzeitig wird die Entwicklung der Seitentriebe gehemmt. Diesen Mechanismus bezeichnet man als die apikale Dominanz der Pflanzen. Während des Vermessens der Pflanzen zeigte sich ein weiterer Phänotyp, die Pflanzenarchitektur betreffend, denn die Überexpressionslinie *35S::SCL8* entwickelte keine apikale Dominanz mehr. Die Seitensprosse dieser Linie waren länger als der Hauptspross (Abb. 52b). In den zu untersuchenden Überexpressionslinien wurde jeweils die Länge des Haupttriebes mit der Länge des höchsten Seitentriebes ins Verhältnis gesetzt.

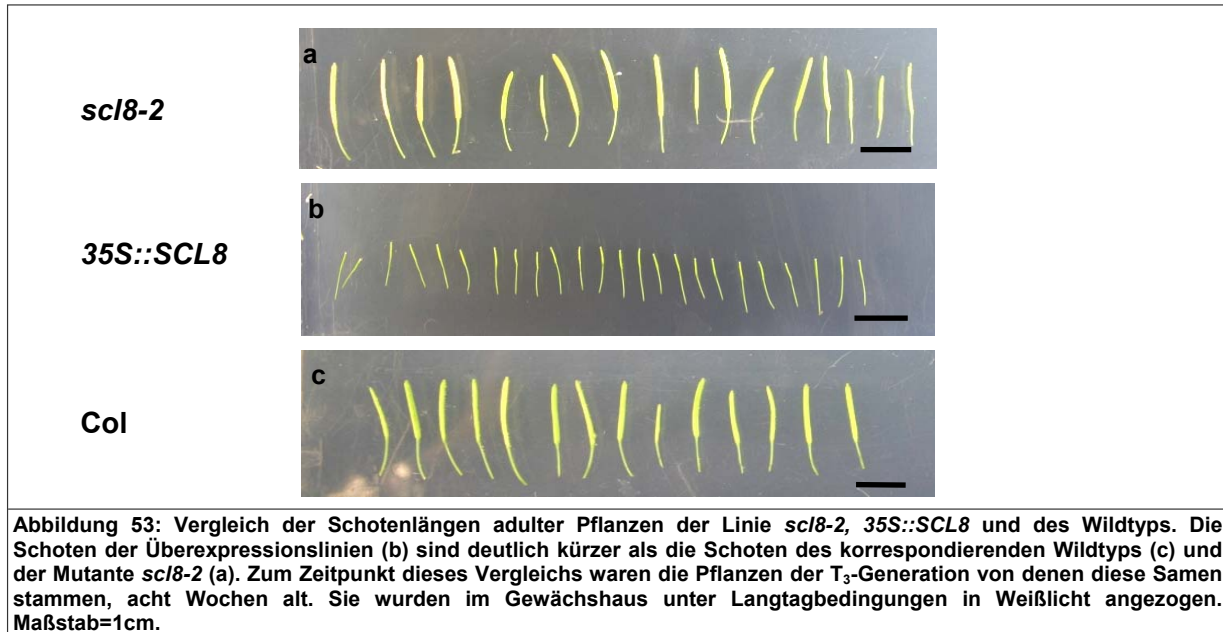
Das Verhältnis der Länge des Haupttriebs zur Länge des längsten Seitentriebs der Überexpressionslinien war dabei signifikant geringer als das der Mutante und des Wildtyps Columbia (Abb. 52a).



3.4.1.13 Die Schoten der Überexpressionsline *35S::SCL8*

Die reproduktive Phase einer Pflanze beginnt mit der Ausbildung einer Blüte und endet mit der Entwicklung von Früchten oder Samen (Vivian-Smith et al. 2001). Die Fertilisation ist nötig um die Transition der Pflanze von der Blüte zur Frucht zu initiieren. Während der Anzucht der Pflanzen unter Langtagbedingungen in Weißlicht über acht Wochen wurde noch ein weiterer Phänotyp gefunden. Viele Schoten der Überexpressionslinien waren kleinwüchsig und enthielten keine oder wenig Samen. Dabei entwickelten 25% der Pflanzen der Überexpressionslinie *35S::SCL8* nur kleine sterile Schoten, die lediglich 40% der Größe der Schoten des Wildtyps und der Mutanten erreichten (Abb. 53a-c). Es könnte sein, dass der Pollen durch eine Mutation nicht in der Lage ist, die Narbe zu bestäuben.

Aufgrund dieser Vermutung wurde die Bestäubung von Hand durchgeführt, sowohl mit Pollen von Überexpressionslinien *35S::SCL8* als auch mit Pollen des Wildtyps Columbia. Es wurden jeweils fünf Blüten pro Pollenart bestäubt. Keine der bestäubten Blüten entwickelte jedoch reife Schoten. Es entstanden wieder kleine sterile Schoten. Der Pollen ist also nicht ursächlich für die fehlerhafte Entwicklung dieser Schoten. Die Ursache hierfür kann zum Beispiel in einem Entwicklungsschritt nach der Bestäubung gesucht werden oder in der Unfähigkeit der Nabe, den Pollen weiterzuleiten. Für die Beantwortung dieser Frage müssen also noch weitere Versuche durchgeführt werden.

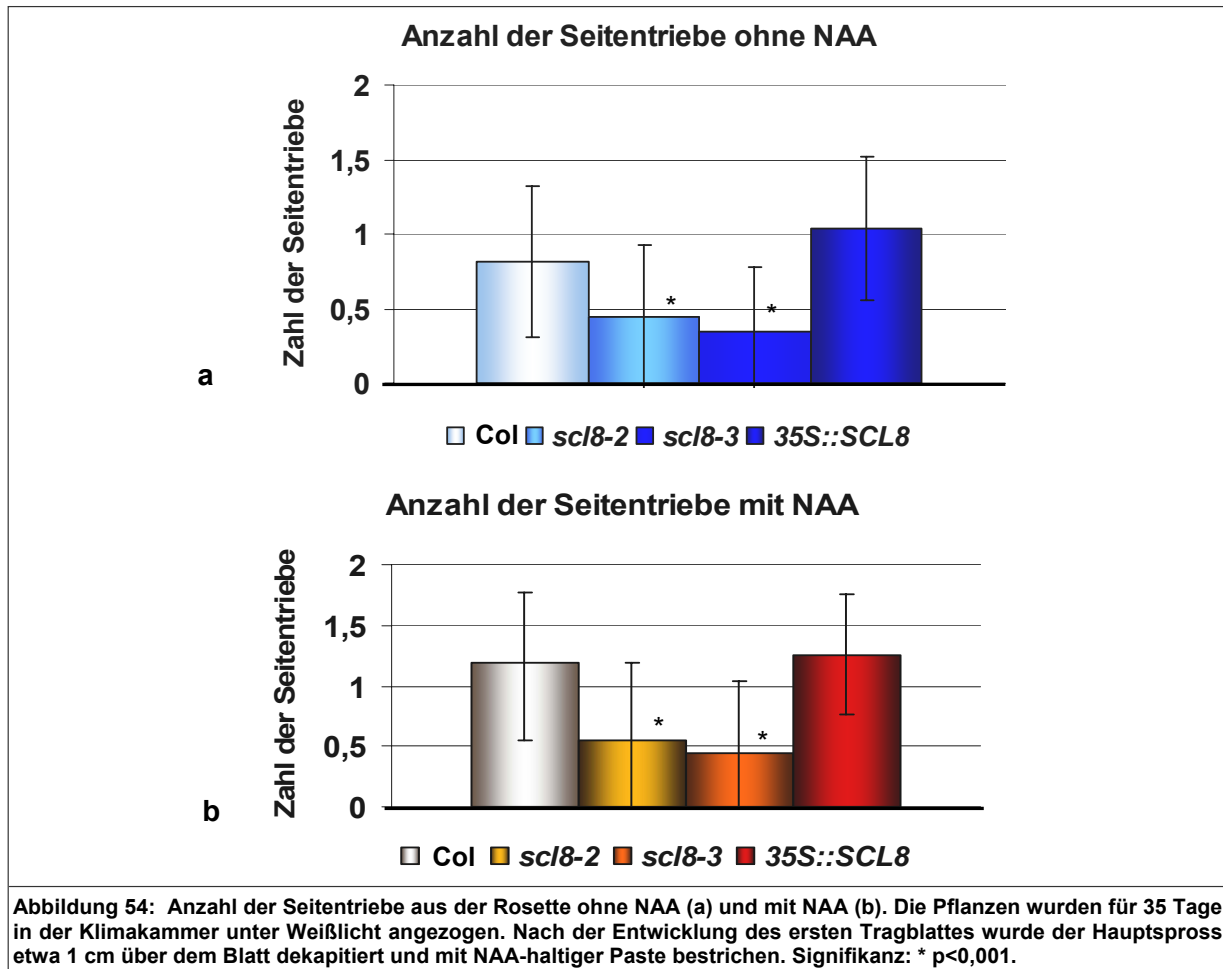


3.4.1.14 Anzahl der Seitensprosse unter Einwirkung von NAA

Pflanzen müssen in der Lage sein sich auf ständig ändernde Umwelteinflüsse einzustellen. Diese Anpassungsfähigkeit wird unter anderem durch die Erneuerung von Zellen durch die Meristeme aufrechterhalten. Die Regulierung des Auswachsens von Seitenknospen aus dem Meristem wird unter anderem durch das Auxin im SAM reguliert. Apikales Auxin führt in *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen in der Regel zu einer Unterdrückung der Seitensprosse. Wird dieses Auxin entfernt, zum Beispiel mechanisch, indem die apikale Spitze abgetrennt wird, beginnt die Pflanze ihre ruhenden Seitenknospen zu aktivieren.

In einem Pilotversuch wurden Pflanzen der Linien *scI8-2*, *scI8-3*, *35S::SCL8* und Col unter Weißlicht angezogen, bis sich das erste Kaulinblatt am Hauptspross entwickelte. Die Pflanzen wurden dann etwa 1 cm über diesem Tragblatt dekapitiert, also abgeschnitten. Dann wurden die Pflanzen jeder Linien in zwei Gruppen geteilt. Einer Gruppe wurde auf diese Schnittstelle täglich frische 10 µM NAA-haltige Paste gegeben. Der anderen Gruppe wurde eine Paste ohne NAA appliziert. Nach einer Woche wurden sowohl die Länge des Seitenspross des ersten Kaulinblattes in Zentimeter gemessen als auch die Anzahl der Seitentriebe, die sich im Verlauf des Versuchs aus der Rosette entwickelten. Die Anzahl der Seitentriebe der Mutanten *scI8-2* und *scI8-3* war unabhängig von der Applikation des exogenen NAAs signifikant kleiner als die des Wildtyps (Abb. 54a).

Die Zugabe von Auxin allein auf die dekapitierte Spitze änderte also nichts an der Zahl der Seitentriebe, die sich aus der Rosette entwickelten (Abb. 54a-b). Dieses Ergebnis war im Vorfeld des Versuchs nicht erwartet worden. Vielmehr ging man davon aus, dass durch die Zugabe von exogenem Auxin die Anzahl der Seitentriebe (B1) deutlich geringer sein würde.



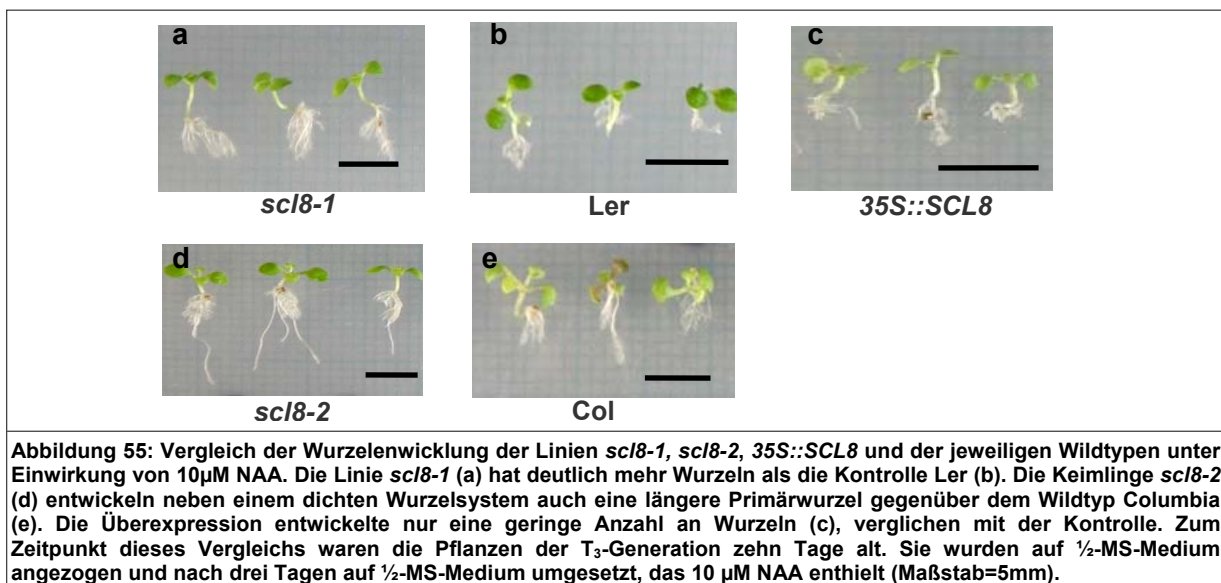
Der zweite zu untersuchende Parameter war die Länge des Seitentriebs in Zentimeter, der sich aus dem beschriebenen ersten Kaulinblatt entwickelte. In diesem zweiten Teil des Versuches konnte kaum ein Unterschied festgestellt werden zwischen den Linien mit und ohne NAA.

3.4.1.15 Einfluss von Auxin auf die Organogenese

Reinhardt et al. konnten im Jahre 2000 zeigen, dass das Phytohormon Auxin ursächlich ist für die Organogenese im vegetativen Meristem von Tomaten und dem Blütenmeristem von *Arabidopsis thaliana*. Die Autoren gehen davon aus, dass Auxin die radiale Position und die Größe der lateralen Organe determiniert. Die Blattprimordien entwickeln sich in einem symmetrischen Muster aus dem Sprossmeristem. Blattprimordien sind Strukturen, aus denen sich später die Blätter bilden. Der Phänotyp der *scl8* Mutanten lässt eine spiralförmige Blattanordnung vermissen (Abschnitt 3.4.1.5). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das SCL8 Protein in die Auxinsignaltransduktion involviert ist. Einige der bisher gezeigten Phänotypen weisen unter anderem darauf hin, dass das Pflanzenhormon Auxin und SCL8 in Zusammenhang stehen könnten. Daher wurden Versuche durchgeführt, die diese Hinweise stützen könnten.

Das Phytohormon Auxin führt unter anderem dazu, dass das Wurzelwachstum der Pflanzen angeregt wird. Zunächst wurden sterilisierte Samen der Linien *scI8-1*, *scI8-2*, *35S::SCL8*, sowie der Wildtypkontrollen Columbia und Landsberg auf ½-MS-Medium vorgekeimt und nach drei Tagen auf 10 µM NAA-Medium ausgelegt. Die Pflanzen entwickelten sich zehn Tage unter Weißlicht. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 55 dargestellt.

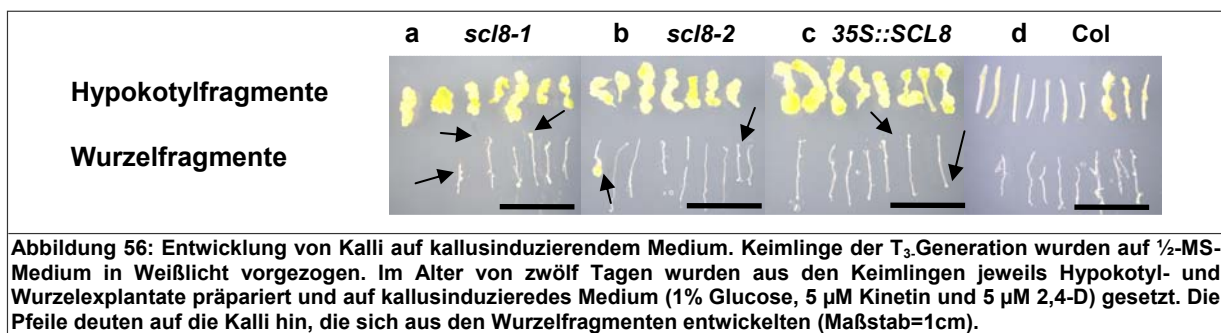
Vergleicht man *scI8-1* (Landsberg Hintergrund) mit dem Ökotyp Landsberg, fällt auf, dass das Wurzelsystem der Mutante *scI8-1* sehr viel dichter gewachsen ist als in der zu vergleichenden Kontrolle Landsberg (Abb. 55b). Ebenso entwickelt die Mutante *scI8-2* ein dichteres Wurzelgeflecht als die Kontrolle Columbia (Abb. 55d). Zusätzlich ist die Primärwurzel der Mutante *scI8-2* länger und deutlicher ausgeprägt als die der Wildtypkontrolle (Abb. 55e). Die Überexpressionslinie *35S::SCL8* hat hingegen im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp nur wenige Wurzeln (Abb. 55c). Die Mutanten reagieren hypersensitiv auf die Stimulation durch Auxin. Die Balance zwischen dem aktivieren und reprimieren von Seitenwurzeln scheint unter anderem durch Auxin in Verbindung mit dem Protein SCL8 reguliert zu sein. Vermutlich unterdrückt das Protein SCL8 das Auswachsen der Seitenwurzeln. Das Auxin scheint hierzu antagonistisch zu wirken und für das Auswachsen der Seitenwurzeln eine Rolle zu spielen.



Auf kallusinduzierendem Medium wurde die Entwicklungsfähigkeit der *scI8* Mutanten, der Überexpressionslinien *35S::SCL8* und des Wildtyps Columbia auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Kalli zu entwickeln. Unter einem Kallus versteht man einen Gewebekomplex undifferenzierter Zellen, der sich aus einem Gewebestück oder einer Zelle entwickelt. Die Entwicklung der Kalli auf diesem speziellen Medium ist ein Indikator für die Sensitivität der zu untersuchenden Linie auf Auxin und Cytokinin.

Es wurden 5 mm lange Stücke aus dem Hypokotyl und den Wurzeln der Linien *scI8-1*, *scI8-2*, *35S::SCL8* und des Wildtyps Columbia wurden aus zwölf Tage alten Keimlingen entnommen und auf ein kallusinduzierendes Medium umgesetzt, das neben 1% Glucose noch die Hormone Kinetin und das Auxinderivat 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (=2,4-D) enthielt. Nach einer Woche unter Weißlicht wurden die Kalli analysiert. Die Hypokotylexplantate der Mutanten *scI8-1* und *scI8-2* (Abb. 56a,b), sowie die Überexpressionslinie *35S::SCL8* (Abb. 56c) entwickelten nach einer Woche deutliche Kalli aus den Explantaten des Hypokotyls. Die Wurzelfragmente bildeten nur in den Linien *scI8-1* und *scI8-2* sowie die Überexpressionslinie *35S::SCL8* eine kleine Verdickung am Anfang und am Ende des Explantates aus (Pfeile).

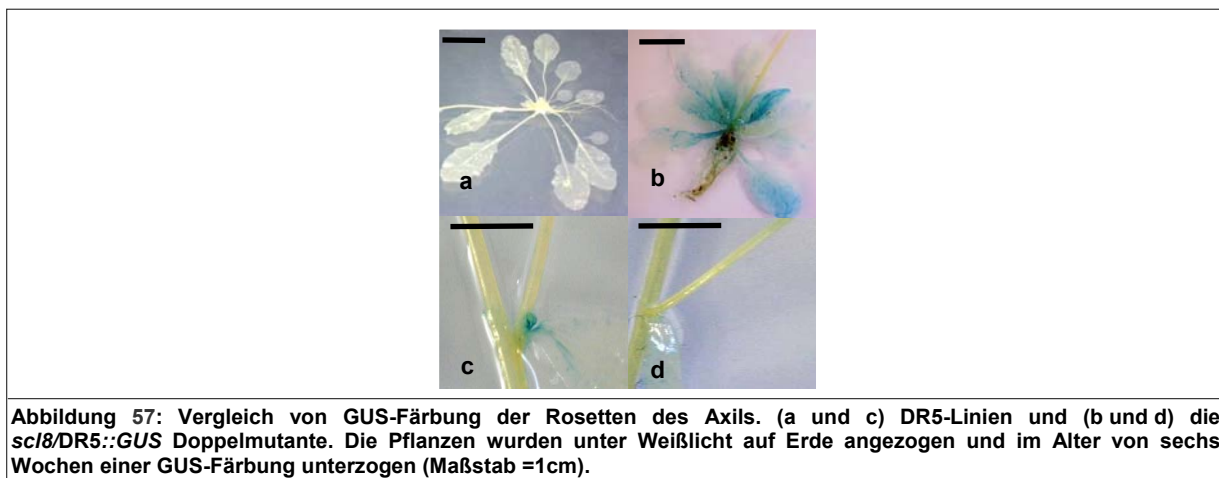
Der Wildtyp Columbia bildet sehr viel schwächere Kalli aus. Die Hypokotylfragmente der Linien *scI8-1*, *scI8-2* und *35S::SCL8* (Abb. 56 a-c) scheinen hingegen wesentlich sensibler gegenüber dem Auxin oder Cytokinin zu reagieren, als der Wildtyp (Abb. 56d). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, dass SCL8 unter anderem von Auxin reguliert werden könnte. In physiologischen Versuchen konnte kein Zusammenhang zwischen SCL8 und Cytokinin nachgewiesen werden. Vermutlich kann die Sensitivität der Linien *scI8-1*, *scI8-2* und der Überexpressionslinie *35S::SCL8* auf das im Medium enthaltene Auxin zurückgeführt werden.



3.4.1.16 Nachweis von Auxin durch das DR5-Element

Das DR5-Element ist ein guter Indikator für die Anwesenheit von Auxin. Hierbei handelt es sich um ein synthetisches Promotorelement, das auf Auxin reagiert und mit einem *GUS* Gen fusioniert ist. In Anwesenheit von Auxin wird die Expression des *GUS* Gen induziert (Ulmasov et al. 1995). Das DR5-Element wird daher häufig in Versuchen als Auxin-Indikator verwendet. Es gibt Arabidopsis Linien, die diese DR5-Konstruktion enthalten. Durch Kreuzung dieser DR5-Konstruktions-Linien mit den entsprechenden Mutanten kann ein histologischer Nachweis geführt werden, ob Auxin in den zu analysierenden Zellen akkumuliert. Pflanzen der Linie *scI8-2* wurden mit Linien gekreuzt, die das DR5-Element enthalten.

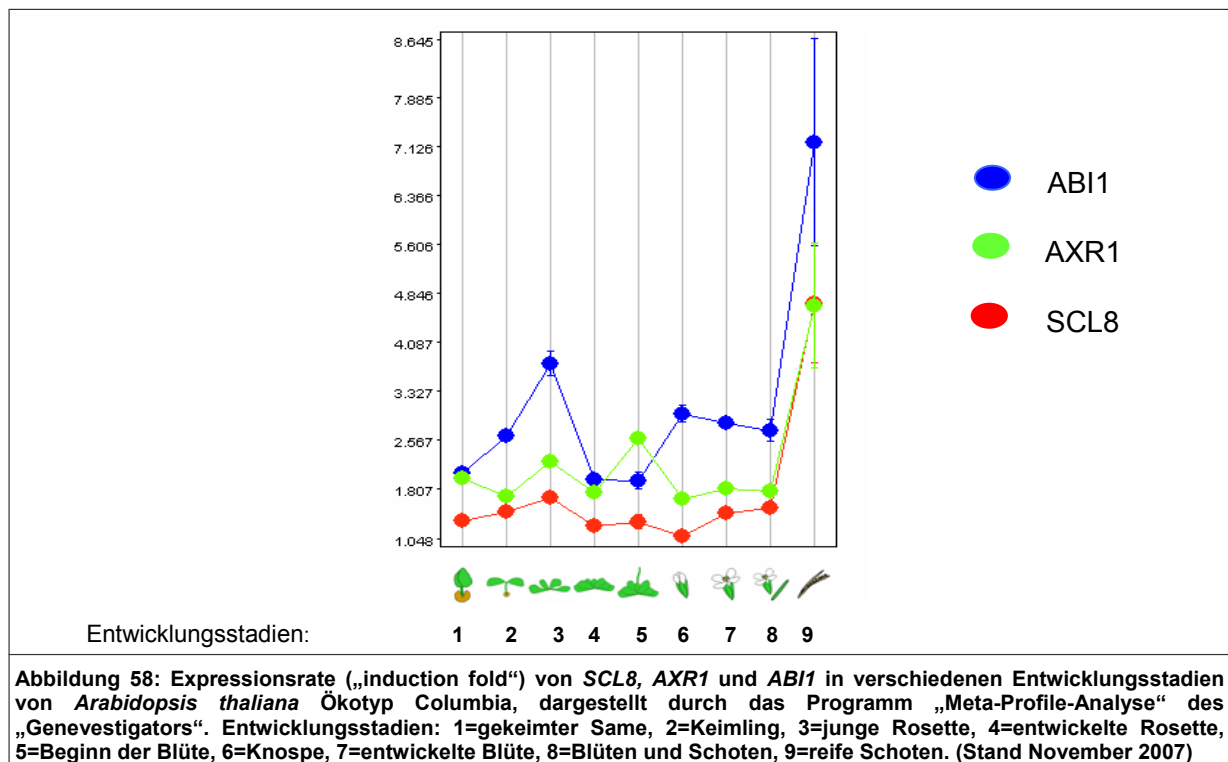
In der zweiten Generation wurden die Linien sowohl mit Hilfe von GUS-Färbung als auch durch PCR auf Homozygotie untersucht. Im Abstand von zwei Tagen wurden von jeder dieser drei Linien je zwei Pflanzen für zwanzig Stunden in X-Gluc-Lösung inkubiert. Erst sechs Wochen nach der Keimung konnte ein Unterschied in der GUS-Färbung gezeigt werden. Der deutlichste Unterschied ergab sich in der Färbung der Rosetten. Die Rosettenblätter der *sc/8/DR5::GUS* Mutante (Abb. 57b) waren sehr deutlich gefärbt, während bei den DR5-Pflanzen (Abb. 57a) keine GUS-Färbung nachzuweisen war. Bezüglich der axialen Knospen war zu erkennen, dass die Doppelmutante (Abb. 57d) in diesem Entwicklungsstadium keine GUS-Färbung entwickelte, anders als bei den DR5-Linien (Abb. 57c).



3.4.1.17 Vergleich der Expressionsrate von *SCL8*, *AXR1-12* und *ABI1*

Mit Hilfe des Programms „Meta-Profile-Analyse“ ist es möglich die Expressionsrate verschiedener cDNS hinsichtlich unterschiedlicher Entwicklungsstadien zu analysieren. Die physiologischen Untersuchungen der *sc/8* Mutanten weisen darauf hin, dass das *SCL8* Protein die Architektur der Pflanzen beeinflusst und Auxin eventuell an dieser Regulation beteiligt sein könnte. Aus der Literatur ist eine Mutante bekannt, die einen ähnlichen Phänotyp zeigt wie die Überexpressionslinie *35S::SCL8*. Hierbei handelt es sich um die pleiotrope Mutante *axr1* (=auxin resistant1). Das *AXR1* Gen kodiert für ein Protein, das für viele Auxinantworten der Pflanze verantwortlich ist. Die Mutante *axr1* ist insensitiv gegenüber exogener Auxin-Applikation (Lincoln et al. 1990). Dies deutet darauf hin, dass Auxin einen entscheidenden regulatorischen Einfluss auf das Auswachsen der Achselknospen ausübt (Stirnberg et al. 1999). Wie bereits unter Abschnitt 3.1.2.1.1 beschrieben, gibt es Hinweise darauf, dass auch ABA an der Regulation des *SCL8* Gens beteiligt sein könnte. Diese Hinweise sollten unter anderem durch einen „digitalen Northern“ zeigen, ob es zu einer Ko-Expression von *ABI1* und *SCL8* kommen könnte. Der Verlauf und die Tendenz der Expression über alle Entwicklungsstadien ist, abgesehen vom Keimlingsstadium, zwischen *SCL8* und *AXR1* sehr ähnlich (Abb. 58).

Die Expressionsrate von *AXR1* ist, außer in den reifen Schoten, grundsätzlich etwas höher (Abb. 58). Die Expressionslevel von *ABI1* und *SCL8* sind in gekeimten Samen etwa gleich. Weiter ist zu bemerken, dass alle drei Gene eine erhöhte Expression in jungen Rosetten zeigen und zur entwickelten Rosette hin die Expression der drei Gene etwas abnimmt. Besonders auffällig ist die hohe Expressionsrate aller drei Gene in den reifen Schoten (Abb. 58). Das ist ein Hinweis darauf, dass alle drei Proteine an der Entwicklung der Samen beteiligt sind. Hinsichtlich *SCL8* korreliert die Grafik mit den Expressionsmuster die in den GUS-Versuchen (Abb. 11) ermittelt wurden und durch die Microarray-Daten (Abb. 18) bestätigt wurden.



3.4.2 Charakterisierung der *sc123* Mutanten und der Überexpressionslinie 35S::*SCL23*

Die phänotypische Analyse der *sc123* Mutanten erwies sich als schwierig. Pflanzen der Linien *sc123-1* und *23-2*, sowie der Überexpressionslinien 35S::*SCL23*, die bis zu zehn Wochen unter Langtagbedingungen im Weißlicht wuchsen, zeigten keinerlei phänotypische Unterschiede zum korrespondierenden Wildtyp. Die GUS-Färbung konnte lediglich bis zum 15. Tag im apikalen Meristem nachgewiesen werden.

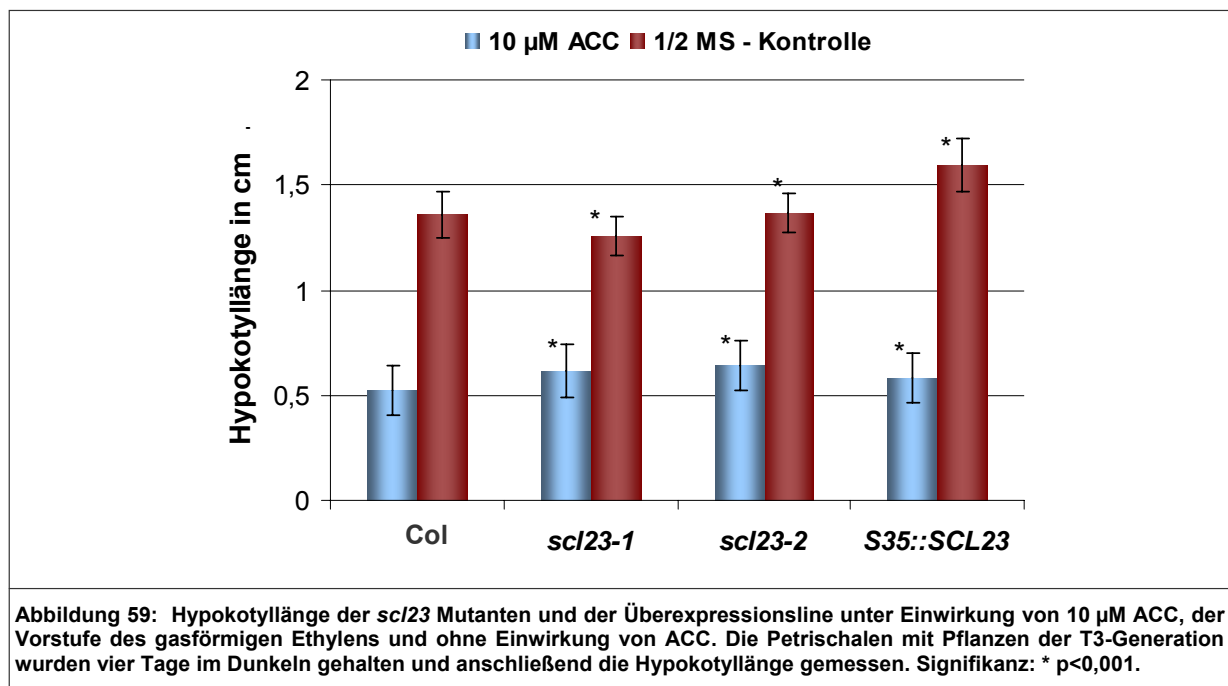
3.4.2.1 Vergleich der Expressionsrate von *SCL23* und *SCR*

Mit Hilfe des Programms „Genecorrelator“ ist es möglich verschiedene Gene bezüglich ihrer Ko-Expression zu analysieren. Der Vergleich der Expression von *SCL23* und *SCR* weist darauf hin, dass diese Gene nicht koexprimiert sind. Hinsichtlich der phylogenetischen Verwandtschaft war dieses Ergebnis zunächst überraschend.

Diese Daten stützen jedoch die Ergebnisse der Expressionsmuster durch die GUS-Färbung. Das indizierte, dass *sc/23* keinen Wurzelphänotyp entwickelte, im Gegensatz zur *scr* Mutante (Abschnitt 2.1.2).

3.4.2.2 Hypokotylllänge der *sc/23* Mutanten und der Überexpressionslinie 35S::*SCL23*

Die Pflanzen des Wildtyps Columbia reagieren in der Regel auf Ethylen mit einem sogenannten „Triple respond“, also mit einer „dreifachen“ Antwort (Ecker et al. 1987, Guzmann et al. 1990). Ihr Hypokotyl ist verkürzt und gleichzeitig verdickt. Zudem bilden diese Pflanzen einen verstärkten apikalen Haken aus, der grundsätzlich das apikale Meristem schützen soll. Aufgrund der Ergebnisse der Microarray-Daten (Abb. 21) wurden die Linien der *sc/23* Mutante auf ihre Sensitivität bezüglich Ethylen getestet. Die Keimlinge wuchsen während des Versuches vier Tage im Dunkeln auf ½-MS-Platten, die 10 µM ACC enthielten. Am Ende des Experiments wurden die ½-MS-Platten mit den Hypokotylen auf Millimeterpapier gelegt und gemessen. Das Ergebnis zeigte, dass die Mutanten *sc/23-1* und *sc/23-2* signifikant länger auf dem ACC-Medium waren und somit weniger sensitiv auf das Ethylen reagierten als der korrespondierende Wildtyp (Abb. 59). Vergleicht man die Kontrollplatte (ohne ACC), so wird deutlich, dass die Hypokotyle ohne Einwirkung von ACC kürzer sind als der Wildtyp Columbia. Im Gegensatz dazu entwickelte die Überexpressionslinie 35S::*SCL23* signifikant längere Hypokotyle auf ACC-Medium (Abb. 59).



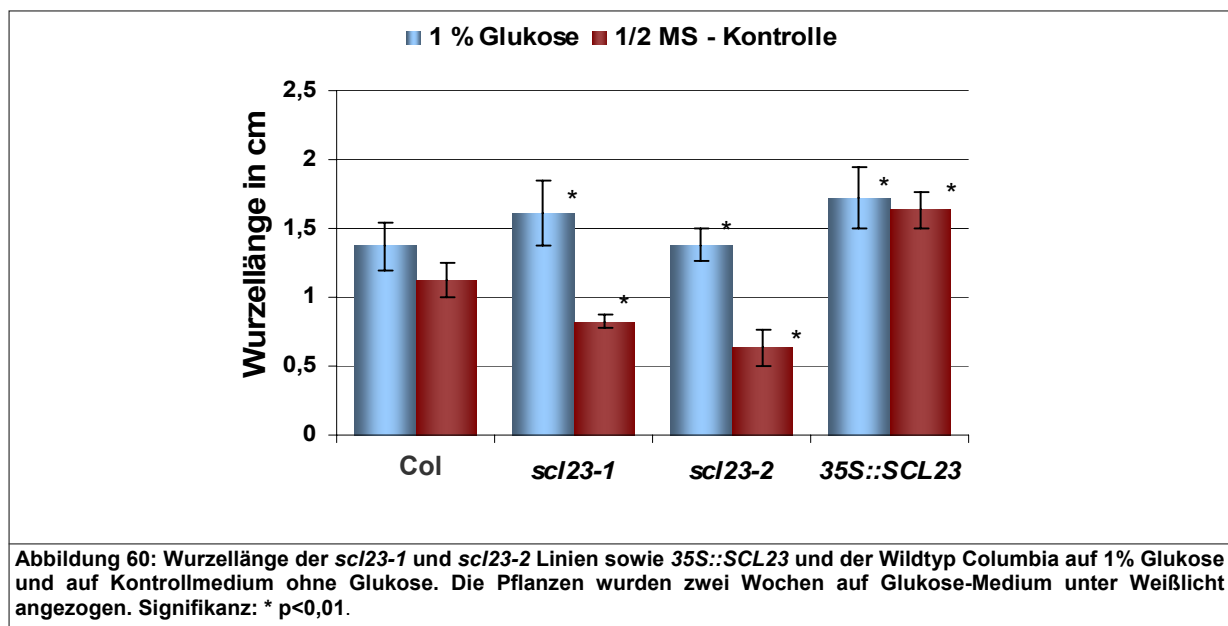
In Experimenten mit *SCL23-GUS*-Fusions-Linien konnte, drei Tage nach deren Keimung, gezeigt werden, dass die Kotyledonen von dieser Linien im Dunkeln unter Einfluss von Ethylen blau gefärbt waren.

Die Kontroll-Keimlinge, die parallel dazu im Dunkeln wuchsen, entwickelten keinerlei Blaufärbung. Dieses Ergebnis ist ein Anhaltspunkt dafür, dass Ethylen in die Regulierung der Genexpression von *SCL23* involviert sein könnte.

3.4.2.3 Wurzellänge der *sc/23* Mutanten und der Überexpressionslinie *35S::SCL23*

Die Analyse der Microarray-Daten wies darauf hin, dass die Genexpression von *SCL23* durch drei Stresskonditionen angehoben werden kann. Dabei handelt es sich um ACC, dem Vorläufer von Ethylen, das Ethylen selbst und die Glukose. Für Pflanzen ist es unter anderem wichtig auf Zucker zu reagieren. Die Effekte gelösten Zuckers auf pflanzliche Entwicklung und Metabolismus sind noch weitgehend unbekannt (Gibson et al. 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Pilotexperimente durchgeführt, die erkennen ließen, dass die Mutanten *sc/23-1* und *sc/23-2* auf Glukose längere Wurzeln entwickelten, als die korrespondierende Wildtypkontrolle (Abb. 60).

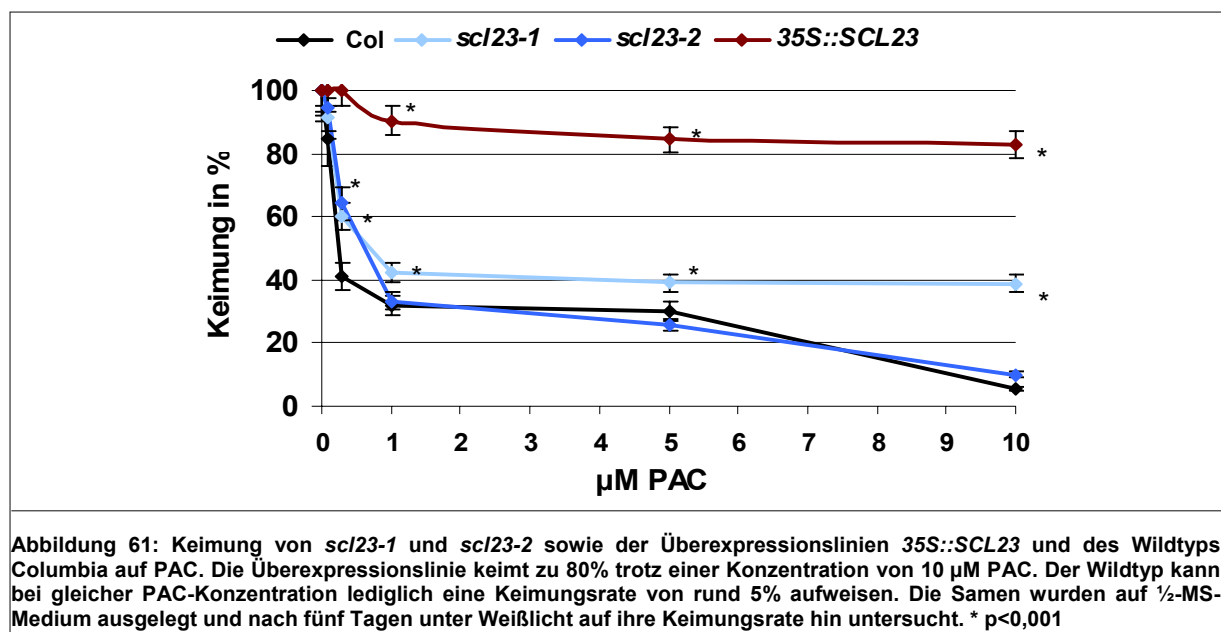
Im Vergleich dazu sind die Wurzeln auf Medium ohne Glukose signifikant kürzer im Vergleich zu Columbia (Abb. 60). Die Überexpressionslinie *35S::SCL23* entwickelte sowohl auf $\frac{1}{2}$ -MS-Medium mit Glukose, als auch auf $\frac{1}{2}$ -MS-Medium ohne Glukose einen signifikanten Phänotyp. Die Wurzeln dieser Linie waren unter beiden Bedingungen deutlich länger als der Wildtyp. Überraschend war die Tatsache, dass ein Phänotyp im Wurzelwachstum zu erkennen war, da die GUS-Expressionsmuster keinerlei Hinweis auf eine Expression in der Wurzel gab. Die GUS-Färbung war jeweils nur in den oberirdischen Teilen der Pflanze detektierbar (Abschnitt 3.1.1.2).



3.4.2.4 Keimung auf Paclobutrazol

Das Phytohormon Gibberellinsäure löst unter anderem die Fruchtbildung, das Internodienwachstum und die Keimung aus. PAC wird über die Wurzel aufgenommen und über das Xylem transportiert, bevor es in Blättern akkumuliert wird. Es handelt sich um ein Herbizid, das die Gibberellin-Biosynthese in Pflanzen hemmt. Dieser Wachstumsregulator [(2RS,3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1,2,4-triazol-1-yl)-pentan-3-ol] ist ein Triazol-Derivat und wurde zunächst als Inhibitor des Sprosswachstums in Apfelbäumen eingesetzt (Wang et al. 1986). Durch PAC wird die Keimfähigkeit von Wildtypsamen von *Arabidopsis* inhibiert. In Keimungsversuche mit „Scarecrow-like“ Mutanten wurden Samen unter anderem auf PAC-haltigem ½-MS-Medium ausgesät. Es zeigte sich, dass die Überexpressionslinie 35S::SCL23 auch auf hohen PAC-Konzentrationen in der Lage waren zu keimen.

Aus Abbildung 61 lässt sich entnehmen, dass die Überexpressionslinie selbst bei einer Konzentration von 10 µM PAC noch in der Lage war eine Keimungsrate von knapp 80% zu erreichen (Abb. 61). Alle analysierten Linien keimten zu 100% auf ½-MS-Petrischalen. Eine geringere Keimungsrate der Wildtypkontrolle und der Mutanten *sc/23-1* und *sc/23-2* reduzierte sich ab einer Konzentration von 0,1 µM PAC (Abb. 61). Die Mutante *sc/23-1* zeigte bei Konzentrationen zwischen 1 µM und 10 µM eine in fast konstante Keimungsrate von rund 40 %. Bei der Überexpressionslinie verringerte sich die Keimungsrate erst ab einer Konzentration von mehr als 0,3 µM PAC (Abb. 61). Diese Linie ist also weniger sensitiv gegenüber PAC als die Mutanten und der Wildtyp. Die Samen wurden auf ½-MS-Medium ausgelegt und nach fünf Tagen unter Weißlicht auf ihre Keimungsrate hin analysiert. In einem weiteren Versuch wurden diese Linien auch auf GA₃ ausgelegt. Bei dieser Analyse wurde sowohl auf Keimung als auch auf Wurzellänge geachtet. Es gab keinerlei Hinweise auf Effekte durch die GA₃.

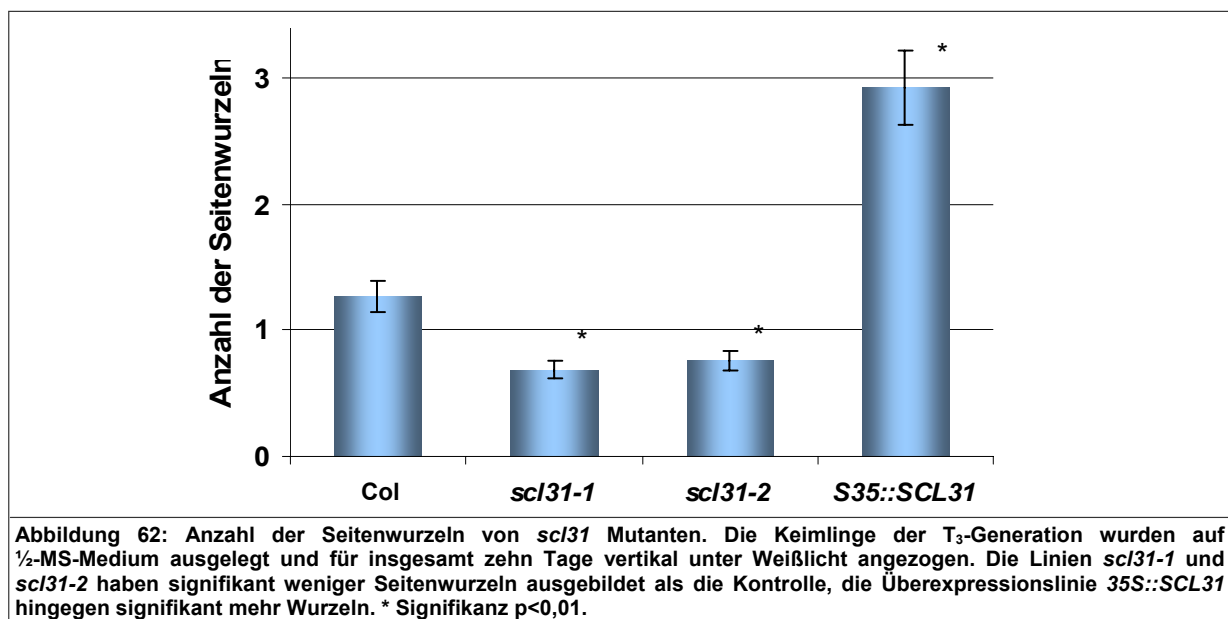


3.4.3 Charakterisierung der *sc/31* Mutanten und der Überexpressionslinie *35S::SCL31*

GRAS-Proteine sind nicht nur bezüglich ihrer Domänen sondern auch im Hinblick auf ihre Funktion in Untergruppen eingeteilt. Das Protein SCL31 wurde phylogenetisch der Unterfamilie „SCL9“ zugeordnet. Aus dieser Unterfamilie wurden bisher noch keine Mitglieder charakterisiert. Es gibt bisher keine Hinweise darauf, in welche möglichen Signaltransduktionswege die Proteine dieser Unterfamilie involviert sein könnten. Die Expressionsmuster der Promotor-*GUS*-Linien, angezogen auf ½-MS-Medium, deuteten auf eine Funktion im apikalen Meristem, in den Leitbündel und in der Entwicklung von Seitenwurzeln hin (Abschnitt 3.1.1.3). Aufgrund dieser Tatsache wurde zum einen der Phänotyp der Mutanten in seiner Entwicklung auf Erde über mehrere Wochen verfolgt. Zum anderen wurde die Wurzelentwicklung auf ½-MS-Medium untersucht.

3.4.3.1 Anzahl der Seitenwurzeln von *sc/31* und *35S::SCL31*

Da *SCL31* besonders in Wurzeln exprimiert war (Abschnitt 3.1.1.3) wurde sowohl die Anzahl der Seitenwurzeln, als auch die Länge der Hauptwurzel genauer untersucht. Für die Mutanten *sc/31-1* und *sc/31-2* konnte gezeigt werden, dass sie weniger Seitenwurzeln entwickelten als der Wildtyp (Abb. 62). Die Anzahl der Seitenwurzeln der *35S::SCL31* Linien war signifikant erhöht im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp (Abb. 62).



Dieser Phänotyp passt sehr gut zu dem in Abschnitt 3.1.1.3 (Abb. 15 a-e) gezeigten Expressionsmuster in den Perizykelzellen der Wurzeln. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass SCL31 möglicherweise an der Entwicklung von Seitenwurzeln beteiligt sein könnte.

3.4.3.2 Phyllotaxis der Überexpressionslinie 35S::SCL31

Wie in Abschnitt 3.4.1.5 gezeigt, formiert der Wildtyp seine Blätter in spiraler Form entlang des Hauptsprosses. Sowohl die Überexpressionslinie 35S::SCL31 als auch die Überexpressionslinie 35S::SCL8 entwickelten eine dekussierte Blattstellung und eine zweite nicht ruhende Knospe, die aus der Achsel des Kaulinblattes herauswuchs. Die Pflanzen der Überexpressionslinie 35S::SCL31 zeigten häufig eine dekussierte Blattanordnung (Abb. 63 b-d).

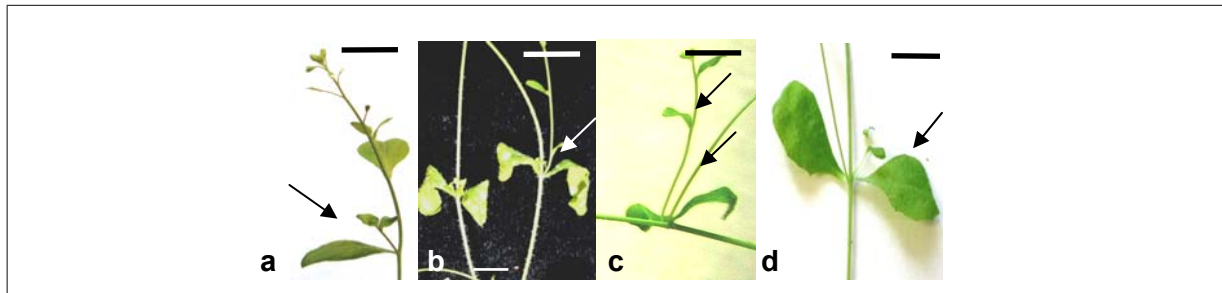


Abbildung 63: Die 35S::SCL31 Überexpressionslinien der T₃-Generation im Alter von sechs Wochen. Sie entwickelten sowohl eine dekussierte Blattstellung (Pfeile a, c), als auch zusätzliche Seitentriebe aus der Achsel des Kaulinblattes (Pfeile b, c). Im Vergleich dazu entwickelt die Wildtypkontrolle eine spirale Blattanordnung und jeweils einen Seitentrieb pro Blattachsel (Pfeil). Die Pflanzen waren unter Langtagkonditionen für sechs Wochen im Gewächshaus angezogen worden. Maßstab=1cm.

3.4.3.3 Anzahl der Seitensprosse von *sc/31* Mutanten

Pflanzen des Wildtyps entwickelten während dieser Studie statistisch gesehen nur 0,8 Seitentriebe \pm 0,7 (Abb. 64). Die Mutante *sc/31* entwickelte eine signifikant höhere Anzahl an Verzweigungen. Die Mutante *sc/31-1* entwickelte nach sechs Wochen unter Langtagbedingungen statistisch 2,8 Seitentriebe (\pm 0,75) (A2) pro Pflanze (Abb. 64). Die Mutante *sc/31-2* entwickelte 2,6 Seitentriebe (\pm 0,65).

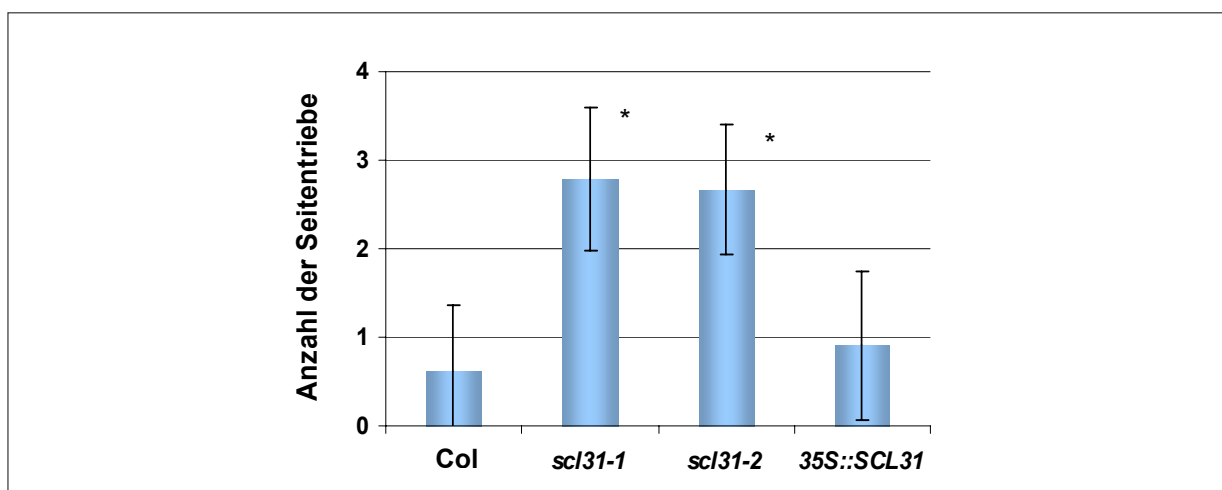
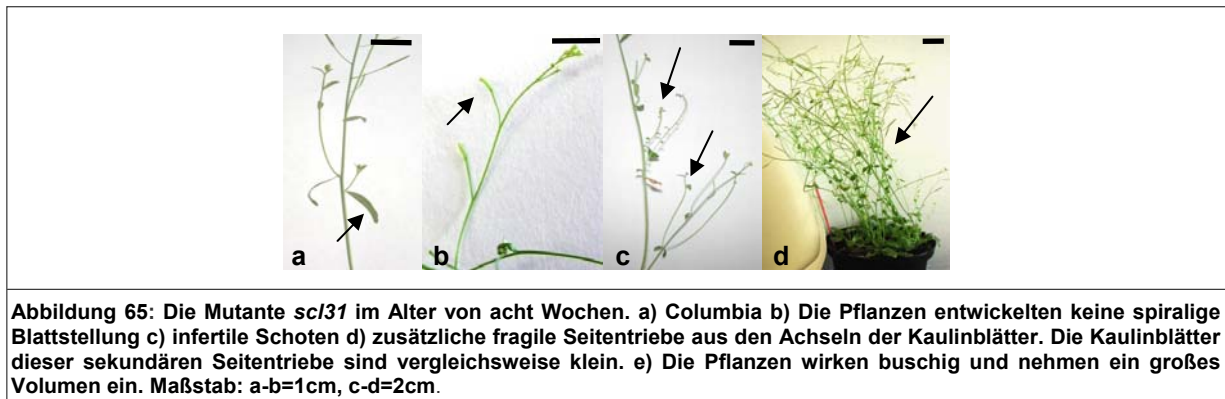


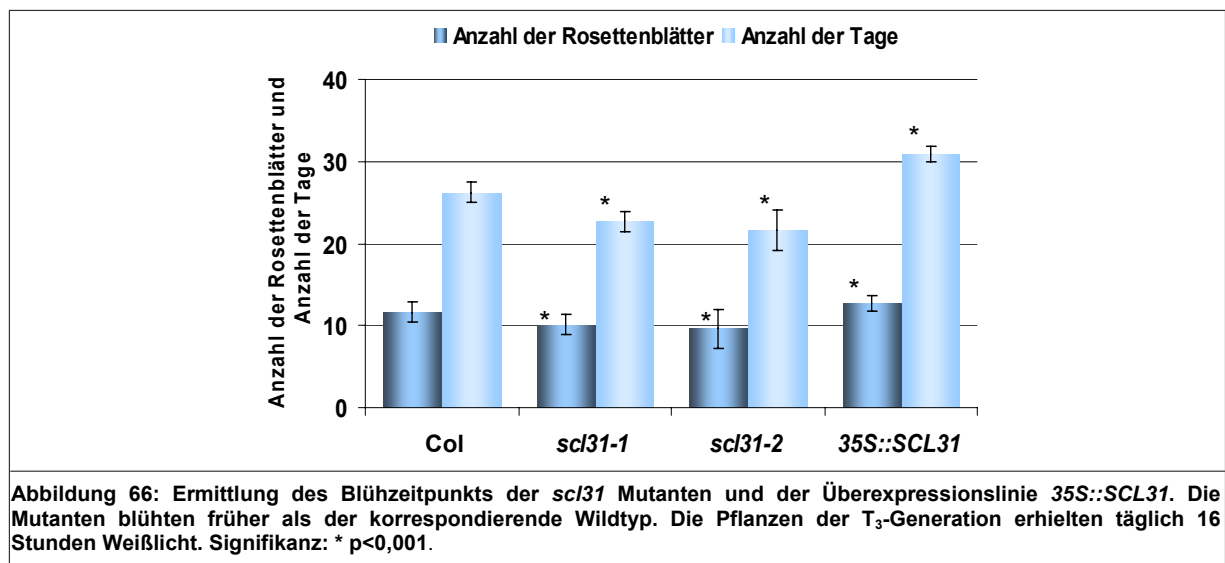
Abbildung 64: Anzahl der Seitentriebe, die sich aus dem Haupttrieb der Pflanzen der Linie *sc/31-1* und *sc/31-2* entwickelten. Die Mutanten hatten signifikant mehr Seitensprosse als der vergleichbare Wildtyp. Die Überexpressionslinie 35S::SCL31 entwickelte sich dabei entsprechend dem Wildtyp. Die Pflanzen der T₃-Generation waren unter Langtagkonditionen für sechs Wochen im Gewächshaus angezogen worden. Signifikanz: * p < 0,001.

Erste Analysen zeigten, dass *sc/31*, ähnlich der *sc/8* Mutante, keine spirale Blattanordnung entwickelte (Abb. 65c). Die Seitentriebe standen sich gegenüber. Einige Tage nachdem sich ein Seitentrieb aus der Achsel des Kaulinblatt entwickelte, begann ein zusätzlicher, viel fragilerer Seitentrieb, aus der Achsel herauszuwachsen. Dieser sekundäre Seitentrieb entwickelt kleine Kaulinblätter und infertile Schoten (Abb. 65b). Durch die Vielzahl an Verzweigungen wirkten die Pflanzen buschiger als der Wildtyp (Abb. 65d).



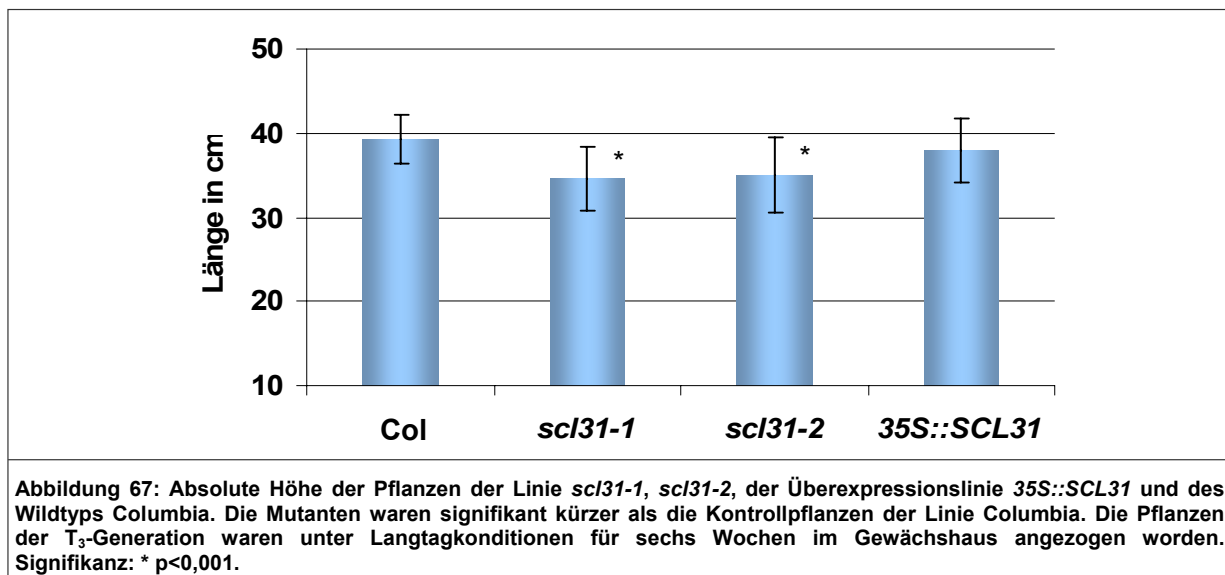
3.4.3.4 Ermittlung des Blühzeitpunkts

Während der Vermessung der Pflanzen konnte gezeigt werden, dass sich die Blühzeit der mutanten Linien *sc/31-1*, *sc/31-2* sowie der Überexpressionslinie *35S::SCL31* von der des Wildtyps unterschied (Abb. 66). Die beiden Mutanten *sc/31-1* und *sc/31-2* blühten signifikant früher als der Wildtyp (Abb. 66). Der Blühzeitpunkt der Überexpressionslinie *35S::SCL31* war verzögert. Das Ergebnis wurde sowohl durch die Anzahl der Rosettenblätter, als auch der Anzahl der Tage bis die Pflanzen zur Blüte kamen, bestätigt. Die Versuche wurden unter Langtagbedingungen durchgeführt bei einer täglichen Belichtung von 16h.



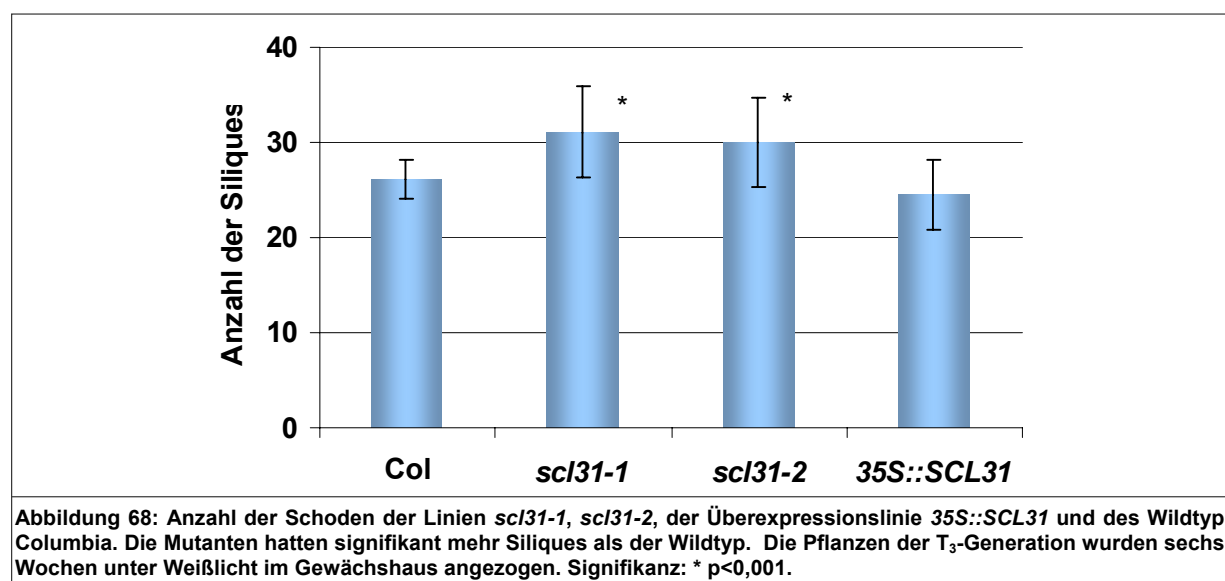
3.4.3.5 Absolute Länge der Pflanzen

Adulte *Arabidopsis* Wildtyppflanzen entwickeln eine absolute Länge von 39,6 cm (+/- 2,4 cm) (Abb. 67). Die Mutanten *sc/31-1* und *sc/31-2* waren mit einer Länge von 33,5 cm (+/- 4,1 cm) bzw. 34,2 cm (+/- 4,5 cm) signifikant kürzer als der Wildtyp (Abb. 67). Die Pflanzen wurden für sechs Wochen unter Langtagbedingungen in Weißlicht angezogen und waren signifikant kürzer als der Wildtyp.

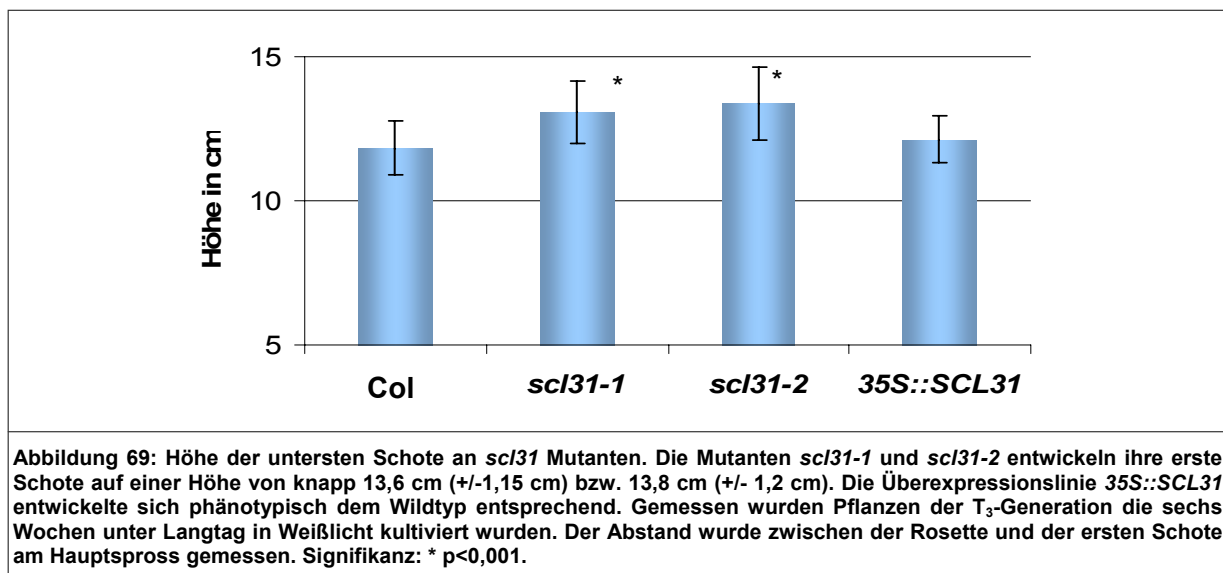


3.4.3.6 Phänotypische Untersuchungen der Schoten

Neben der phänotypischen Analyse der Linien *sc/31-1*, *sc/31-2*, den Überexpressionslinien *35S::SCL31* und der Kontrolle auf Gewebekultur, wurden die Pflanzen auch auf Erde über mehrere Wochen beobachtet und vermessen.



Die Pflanzen waren unter Langtag für sechs Wochen unter Weißlicht im Gewächshaus kultiviert worden. Zunächst wurde die Anzahl der Schoten untersucht. Eine adulte *Arabidopsis* Wildtyppflanze bildete durchschnittlich 25 Schoten ($\pm 2,1$) pro Pflanze aus. In Entwicklungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Mutanten *sc/31-1* und *sc/31-2* im Vergleich zum Wildtyp 31 Schoten ($\pm 4,5$) bzw. 30 Schoten ($\pm 4,6$) ausbildeten (Abb. 68). Die Anzahl der Schoten wurde jeweils am Haupttrieb ermittelt. Während der Wildtyp seine erste Schote in einer Höhe von 11,8 cm ($\pm 0,9$ cm) entwickelt, fand sich die erste Schote in den Mutanten *sc/31-1* und *sc/31-2* auf einer Höhe von 13,6 cm ($\pm 1,15$ cm) bzw. 13,8 ($\pm 1,2$ cm) (Abb. 69). Die Mutante unterschied sich vom Wildtyp dahingehend, dass der Abstand zwischen Rosette und der ersten entwickelten Schote größer war als bei den Wildtyppflanzen (Abb. 69). Die Überexpressionslinie hingegen entwickelte sich diesbezüglich ähnlich dem Wildtyp (Abb. 69). Die Messung erfolgte über die Distanz zwischen der Oberseite der Rosette und der ersten Schote. Gemessen wurde zu dem Zeitpunkt, zu dem sich diese erste Schote gelb färbte.



Ein weiterer Parameter war die Untersuchung des Abstandes zwischen den Schoten der zu analysierenden Linien. Bei Wildtyppflanzen lässt sich ein Abstand von 8,2 mm ($\pm 0,41$ mm) ermitteln (Abb. 70), während der Abstand zwischen den Schoten bei den Linien *sc/31-1* und *sc/31-2* im Mittelwert 4,1 mm ($\pm 0,22$ mm) bzw. 5,1 mm ($\pm 0,35$ mm) betrug (Abb. 70). Der Unterschied zwischen den Mutanten *sc/31-1*, *sc/31-2* und der Wildtypkontrolle war signifikant, während zwischen der Überexpressionslinie *35S::SCL31* und der Wildtypkontrolle kein signifikanter Unterschied zu erkennen war. Zusammengefasst bedeutet das, dass die T-DNS Linien *sc/31-1* und *sc/31-2* mehr Schoten auf kürzerer Distanz entwickelten als der Wildtyp.

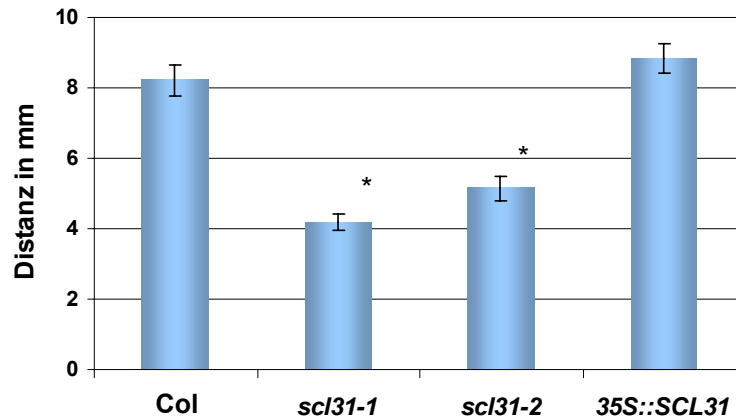


Abbildung 70: Der Abstand zwischen den Schoten war in den Linien *scl31-1* und *scl31-2* deutlich geringer als in der Wildtypkontrolle. Die Überexpressionslinie hingegen entwickelte sich dem Wildtyp entsprechend. Die Pflanzen der T₃-Generation wurden sechs Wochen unter Weißlicht im Gewächshaus angezogen. Signifikanz: * p<0,001.

3.4.3.7 Verminderte Abszission der Kronblätter

Die Wildtyppflanzen und die Mutanten der Linien *scl31-1* und *scl31-2* warfen nach der Entwicklung reifer Schoten ihre Kronblätter (=Petalen) ab. Dieser Vorgang wird als Abszission bezeichnet. Lediglich die obersten sechs bis acht Schoten einer Pflanze tragen noch vertrocknete Kronblätter. In der Überexpressionslinie *35S::SCL31* war die Abszission der Kronblätter an den Schoten vermindert (Abb. 71). An den Schoten der Pflanzen waren die nicht abgeworfenen Kronblätter der Linie *35S::SCL31* bis zur zwanzigsten Schote (+/- 2,9) zu finden (Abb. 71).

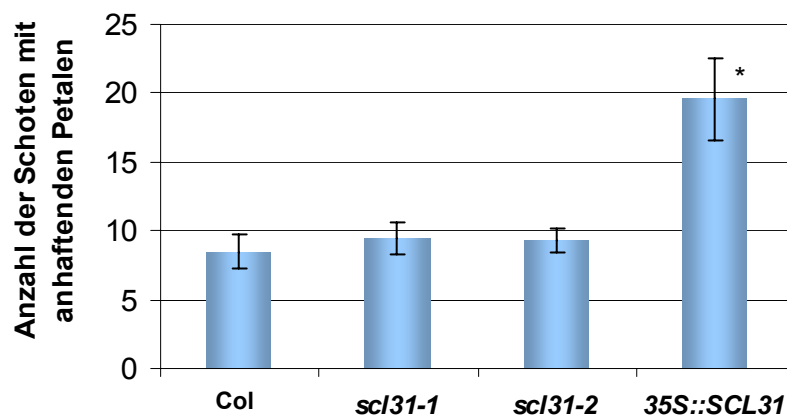


Abbildung 71: Anzahl der Schoten mit anhaftenden Petalen. Die Überexpressionslinie *35S::SCL31* trug an durchschnittlich 20 Schoten noch vertrocknete Sepalen, verglichen mit der korrespondierenden Wildtyplinie Columbia. Bei den Mutanten *scl31-1* und *scl31-2* konnte dieser Phänotyp nicht nachgewiesen werden. Samen der T₃-Generation waren sechs Wochen unter Weißlicht kultiviert worden. Signifikanz: * p<0,001.

3.5 Mögliche additive Effekte in *sc/8/sc/31* Doppelmutanten

Zwischen den Mutanten *sc/8* und *sc/31* sowie zwischen den jeweiligen Überexpressionslinien zeigten sich phänotypische Ähnlichkeiten bezüglich deren Phyllotaxis und der Verzweigung

(Abschnitt 3.4.1.5 und 3.4.3.2). Auch die Expressionsmuster der beiden Promotor-GUS-Linien glichen sich, insbesondere in den oberirdischen Teilen der Keimlinge (Abschnitt 3.1.1.2). Aufgrund dieser gefundenen Übereinstimmungen wurden die beiden Mutanten *sc/8* und *sc/31* miteinander gekreuzt. Ziel dieser Kreuzung war es, einen möglichen additiven Effekt in der Mutante *sc/8/sc/31* zu finden. Mittels PCR wurde die T₃-Generation der Doppelmutante untersucht. Die ersten phänotypischen Analysen ergaben, dass Pflanzen der Doppelmutanten *sc/8/sc/31* kleiner und verzweigter sind.

3.6 Immunologischer Nachweis der Überexpressionslinien

Die Überexpression der Proteine sollten immunologisch nachgewiesen werden, um zu zeigen, dass diese Linien tatsächlich das jeweilige Protein verstärkt synthetisieren und der Phänotyp darauf zurückzuführen ist.

3.6.1 Herstellung eines SCL8 Anti-Serums

Aus der Aminosäuresequenz von SCL8 wurde zunächst ein Peptid ausgewählt, das synthetisiert wurde und dann kovalent an ein Trägerprotein („Keyhole limpet haemocyanin“ (=KLH)) gekoppelt wurde, um die Wirkung des Antikörpers zu erhöhen. Durch die Bindung an ein großes Trägermolekül werden sie vom Organismus als „fremd“ erkannt und lösen eine Antikörperreaktion aus. Im nächsten Schritt wurden drei Kaninchen damit immunisiert. Nach dem 61. Immunisierungstag wurden Serumproben entnommen. Die Serumproben wurden verwendet und durch Immunoassays getestet.

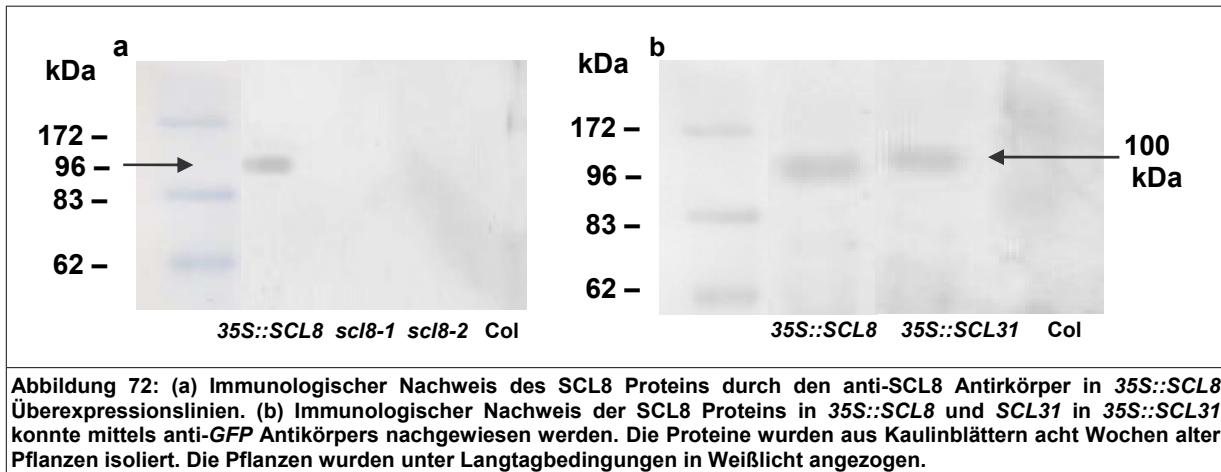
3.6.2 Immunoassay-Analysen mit Hilfe des SCL8 Anti-Serum

Für die Immunoassay-Analyse wurde der gesamte Proteinextrakt aus den *sc/8* Mutanten, den Überexpressionslinien und dem Wildtyp Columbia isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach mehreren Versuchen stellte sich heraus, dass der Antikörper nicht in der Lage war endogenes SCL8 Protein im Wildtyp zu detektieren. Auch durch das Aufreinigen des Antikörpers war es nicht möglich das endogene SCL8 Protein in der Wildtypkontrolle nachzuweisen. Lediglich die Proteinmenge in der Überexpressionslinie war ausreichend um SCL8 nachzuweisen. Durch die transformierte Konstruktion *35S::SCL8::GFP* synthetisierte die Überexpressionslinie ein SCL8 Protein, das mit GFP fusioniert war. Zusammen mit dem GFP, das eine Größe von 25 kDa hat, ergab sich eine zu erwartende Proteingröße von 96 kDa.

Diese Bande konnte in der Tat nachgewiesen werden (Abb. 72). Das endogene, nicht detektierbare SCL8 Protein, hätte eine Größe von 71 kDa.

3.6.3 Immunoassay-Analysen mit GFP Anti-Serum

Die Überexpressionslinien *35S::SCL8* und *35S::SCL31* konnten aufgrund des fusionierten GFP auch mithilfe eines anti-GFP Antikörpers nachgewiesen werden. Die Proteine wurden jeweils aus den Blättern der Linie *SCL8::GFP* bzw. *SCL31::GFP* isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die detektierten Banden entsprachen der erwarteten Größe von *SCL8::GFP* mit einer Größe von 96 kDa und *SCL31::GFP* mit einer Bandengröße von 100 kDa (Abb. 72).

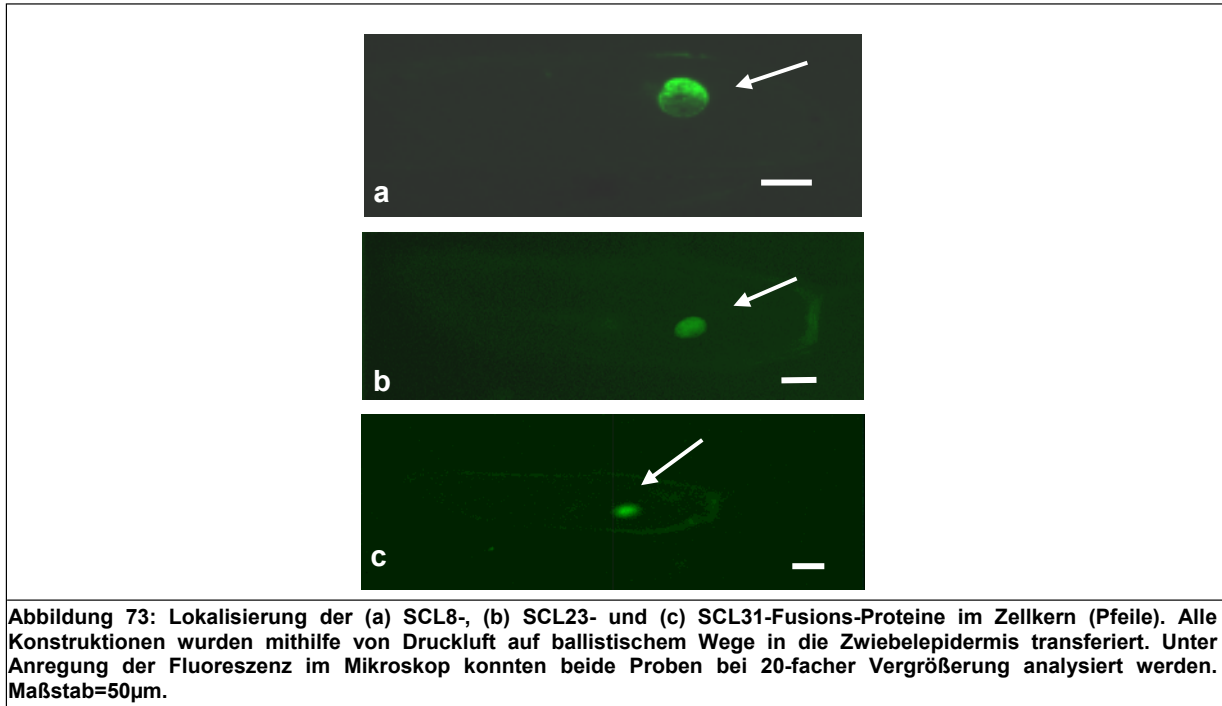


3.7 Lokalisierung der SCL Proteine in der Zelle

Nach den phänotypischen Analysen war ein weiterer wichtiger Schritt die subzelluläre Lokalisierung des Proteins SCL8 innerhalb der Pflanzenzelle zu bestimmen. Es gibt Hinweise darauf, dass es sich bei den SCARECROW-LIKE Proteinen um Transkriptionsfaktoren handeln könnte (Pysh et al. 1999). Bisher konnte dies aber nicht bestätigt werden. Wäre das Protein nur außerhalb des Zellkerns in der Zelle lokalisiert, so wäre diese Hypothese nicht weiter haltbar. Für diesen Versuch wurde zunächst eine entsprechende Konstruktion hergestellt, in dem die *SCL8* Sequenz mit der Sequenz des „GREEN FLUORESCENT PROTEINS“ (GFP) fusioniert wurde. Die *SCL8-GFP*-Fusions-Konstruktion wurde an Goldpartikel gebunden und via Partikelkanone ballistisch in die Epidermiszellen weißer Zwiebeln geschossen. Die Epidermisstücke wurden über Nacht im Dunkeln gehalten und am nächsten Tag ausgewertet.

Das gebildete Fusionsprotein wurde durch Fluoreszenzlicht angeregt und sendete dadurch ein Signal aus, dass mit einem geeigneten GFP-Filter detektiert werden konnte. Das GFP-Signal der *SCL8-GFP*-Proteine (Volllängenprotein) wurde ausschließlich im Zellkern nachgewiesen (Abb. 73a).

Die Lokalisierung der Proteine SCL23 und SCL31 erfolgte in gleicher Weise. Die beiden fusionierten Proteine *SCL23::GFP* (Abb. 73b) und *SCL31::GFP* (Abb. 73c) waren ebenfalls im Kern der Zelle lokalisiert.



3.7.1 Eingrenzung des Kernlokalisierungssignals in *SCL8*

Proteine, die jeweils für eines der Kompartimente vorgesehen sind, tragen eine Sequenz, die das jeweilige Protein „adressiert“. Proteine deren Bestimmungsort der Kern ist, besitzen so genannte Kernlokalisierungssignale (Nuclear Localization Signals = NLS). Für die Eingrenzung der NLS von *SCL8* wurden verschieden lange *SCL8* Konstruktionen mit *GFP* zu fusionieren und transient in Zwiebelepidermiszellen einzubringen. Für dieses Experiment wurden *SCL8* Konstruktionen verschiedener Länge über den Eintrittsklon pENTR/D-TOPO in den *GFP*-Fusionsvektor pK7FWG2,0 rekombiniert. Die *SCL8* Konstruktionen wurden C-terminal an *GFP* fusioniert. Leserastermutationen hätten so zu einem Ausbleiben des *GFP*-Signals geführt, wodurch falsch positive Signale weitgehend ausgeschlossen werden können. Wichtig dabei ist, dass die zu fusionierenden Gene kein Stoppkodon tragen. Das Stoppkodon würde die Fusion zwischen *SCL8* und *GFP* verhindern und die Translation von *SCL8* abbrechen. Die *SCL8-GFP*-Konstruktionen wurden jeweils auf Goldpartikel geladen und via DNS-Partikelkanone transient in Zwiebelepidermiszellen gebracht.

Die Konstruktionen GFP-SCL8 1-640 (Abb. 74a), GFP-SCL8 1-191 (Abb. 74b) und GFP-SCL8 1-544 (Abb. 74c) zeigten, dass das GFP im Zellkern akkumuliert. Zwischen der Konstruktion des Volllängengens (Abb. 74a) und den beiden Konstruktionen GFP-SCL8 1-191 (Abb. 74b) und GFP-SCL8 1-544 (Abb. 74c) ist bezüglich der Lokalisierung des Proteins kein Unterschied zu sehen. Alle drei Konstruktionen enthalten den Sequenzabschnitt 1-191. Die Proteine GFP-SCL8 65-191 (Abb. 74d) und GFP-SCL8 95-191 (Abb. 74e) sind zwar ebenfalls im Zellkern lokalisiert, das GFP ist aber auch marginal im Cytosol detektierbar. Beide Konstruktionen enthalten den Sequenzbereich von 95-191.

Der Konstruktion fehlte ein Teil des variablen N-Terminus, der deletiert wurde. Das *GFP-SCL8* 95-191 (Abb. 74e) war die kleinste Konstruktion, deren Produkt im Kern detektierbar war. Die Produkte der Konstruktionen *GFP-SCL8* 125-228 (Abb. 74f), *GFP-SCL8* 192-640 (Abb. 74g) und *GFP-SCL8* 270-640 (Abb. 74h) sind im Cytosol lokalisiert. All diesen Konstruktionen fehlte zumindest die Sequenz 1-125 des N-Terminus.

In Abbildung 74 ist eine Zwiebelepidermiszelle zu sehen, die nur mit einem GFP-Kontrollvektor transformiert wurde. Das GFP-Signal konnte sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern nachgewiesen werden. Es handelt sich um ein relativ kleines Protein (25 kDa), das in der Lage ist über die Kernporenkomplexe in den Zellkern hinein zu diffundieren. Die Kontrolle war nötig, um die Effizienz und die Nachweismöglichkeit des GFP-Signals zu testen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass sich das NLS im N- und nicht im C-Terminus von SCL8 befand. Aufgrund der Ergebnisse der eingesetzten Konstruktionen könnte sie in den ersten 191 Aminosäureresten des N-Terminus kodiert sein. Die Konstruktionen 1-640 (Abb. 74a), 1-191 (Abb. 74b) und 1-544 (Abb. 74c) enthielten den N-Terminus, und damit auch die ersten 191 Aminosäurereste von SCL8. Da die Konstruktionen 65-191 (Abb. 74d) und 95-191 (Abb. 74e) sowohl im Cytosol als auch im Zellkern zu finden ist, besteht die Möglichkeit, dass mehr als eine Domäne für eine ausschließliche Kernlokalisierung nötig ist. Der Abschnitt 63 bis 191 könnte eine der Domänen tragen, die für den Transport in den Kern nötig sind.

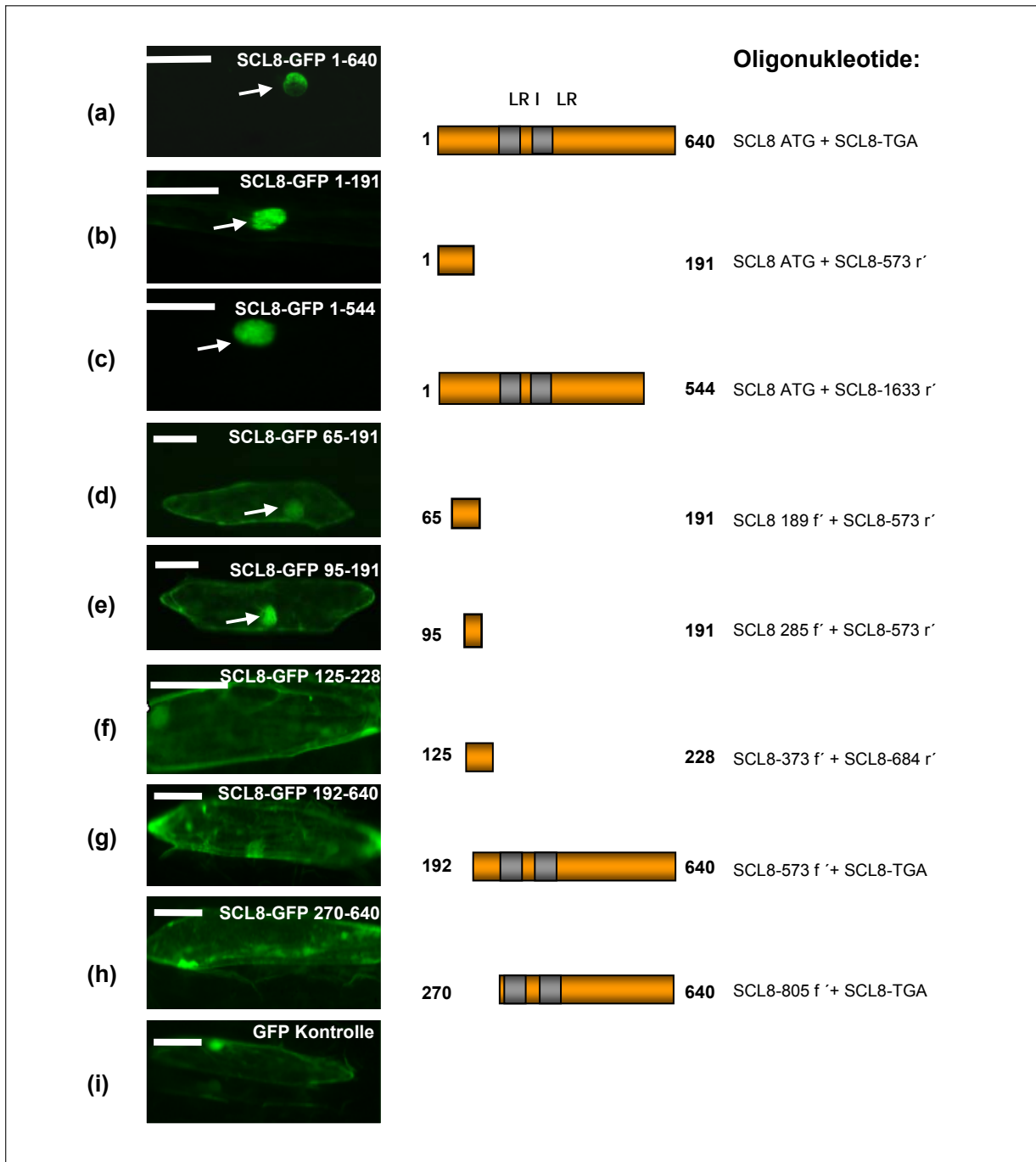


Abbildung 74: Zwiebelepidermiszellen wurden mit verschiedenen langen *SCL8-GFP*-Fusions-Konstruktionen transient transformiert (a-k). Die orangenen Balken (rechts) stellen die Proteinabschnitte und die Position der Aminosäuren dar, die jeweils mit GFP-Protein fusioniert waren. Auf der rechten Seite sind die Oligonukleotide dargestellt, mit denen die jeweiligen Fragmente verschiedener Länge amplifiziert wurden. Das GFP wurde mit Hilfe eines FITC-Fluoreszenzfilters mikroskopisch detektiert. Die Aufnahmen wurden bei 10-facher Vergrößerung gemacht (Maßstab=100µM).

Im N-Terminus des Proteins SCL8 gibt es zwei Motive innerhalb der ersten 105 Aminosäurereste. An Position 42-68 befinden sich zwei Domänen $R(X)_{13}R(X)_9KR$, die einer typischen zweiteiligen Kern-Signalsequenz entsprechen könnten. Kern-Lokalisierungssequenzen zeichnen sich durch fünf basische Aminosäurereste aus, die durch zehn bis zwölf beliebige Aminosäurereste getrennt sind (Adam et al. 1989). Hier findet die Trennung durch dreizehn bzw. neun statt. Aus Vergleichen mit der Literatur kann nicht mit Sicherheit geschlossen werden, ob es sich um ein Kernlokalisierungssignal handelt.

Eventuelle transaktivierende Eigenschaften der GRAS-Proteine können dadurch ebenfalls genauer charakterisiert werden. Die DNS-Sequenzen der Gene, die für die Proteine SCL8, SCL23 oder SCL31 kodieren, wurden aus einer cDNS-Bank mit genspezifischen Oligonukleotiden „8 ATG“ und 8 TGA“, „23 ATG“ und „23 TGA“ sowie „31 ATG“ und „31 TGA“ amplifiziert. Diese Fragmente wurden in die beiden Destinationsvektoren pDEST22 und pDEST23 kloniert. Die Vektoren sind so konstruiert, dass die Gene jeweils entweder an eine Aktivierungs- oder eine Bindedomäne des *GAL4* Transkriptionsfaktors fusioniert wurden. Nach erfolgter Ko-Transformation der entsprechenden Plasmide werden die BD- und AD-Domänen durch Bindung der putativen Fusionsproteine in räumliche Nähe gebracht. Die Expression des *Gal4*-Transkriptionsfaktors ist die unmittelbare Voraussetzung für das Wachstum der verwendeten Hefezellen des Stammes MaV203. Die Expression wurde anhand dreier Reportergene verifiziert.

Je ein rekombinanter pDEST32-Vektor und ein rekombinanter pDEST22-Vektor wurden gemeinsam in die kompetenten Hefen MaV203 transformiert. So konnten alle Proteine untereinander auf Interaktion geprüft werden. Wichtig war es Kontrollen durchzuführen, um falsch-positive Signale auszuschließen. Dabei wurden die pDEST32-Konstruktionen zusammen mit dem Kontrollvektor pEXP-AD502, der dem „leeren“ pDEST22-Vektor entspricht, und die pDEST22-Konstruktionen mit dem Kontrollvektor pDB-LEU in den Hefestamm MaV203 transformiert. Das Plasmid pDB-LEU trägt das Gen *LEU2* und ermöglichte es den Zellen auf Medien zu wachsen, denen diese Komponenten fehlten. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der verschiedenen Vektorkombinationen dargestellt. Die Expression der Reportergene konnte in den Kontrollen von *SCL8* und *SCL31*, DB:*SCL8* bzw. DB:*SCL31*, kombiniert mit dem Kontrollvektor pEXP-AD502, nachgewiesen werden. Die Fusionsproteine DB:*SCL8* und DB:*SCL31* waren auch ohne den Interaktionspartner in der Lage die Expression der Reportergene *HIS3* (=Histidin) und β -*Gal* zu induzieren.

Aus diesem Grund konnte in allen Kombinationen der DB:*SCL8* und DB:*SCL31*-Konstruktionen mit AD-Fusionsproteinen die Expression der Reportergene nachgewiesen werden. In der Kontrolle DB:*SCL23*, kombiniert mit Vektor pEXP-AD502 war keine Transaktivität von *SCL23* zu detektieren (Tabelle 1). Bezüglich der Konstruktion DB:*SCL23* mit AD:*SCL8*, AD:*SCL23* bzw. AD:*SCL31* war weder durch den 3-AT-Test, noch durch den X-Gal-Test eine Expression der Reportergene nachzuweisen.

Tabelle 1: Interaktionen der Proteine SCL8, SCL23 und SCL31. Der Nachweis wurde mithilfe des Zwei-Hybrid-Test-Systems durchgeführt. Die Ergebnisse des 3-AT-Tests und X-Gal-Tests, wurden mittels Expression der Reportergene *HIS3* und β -Gal detektiert.

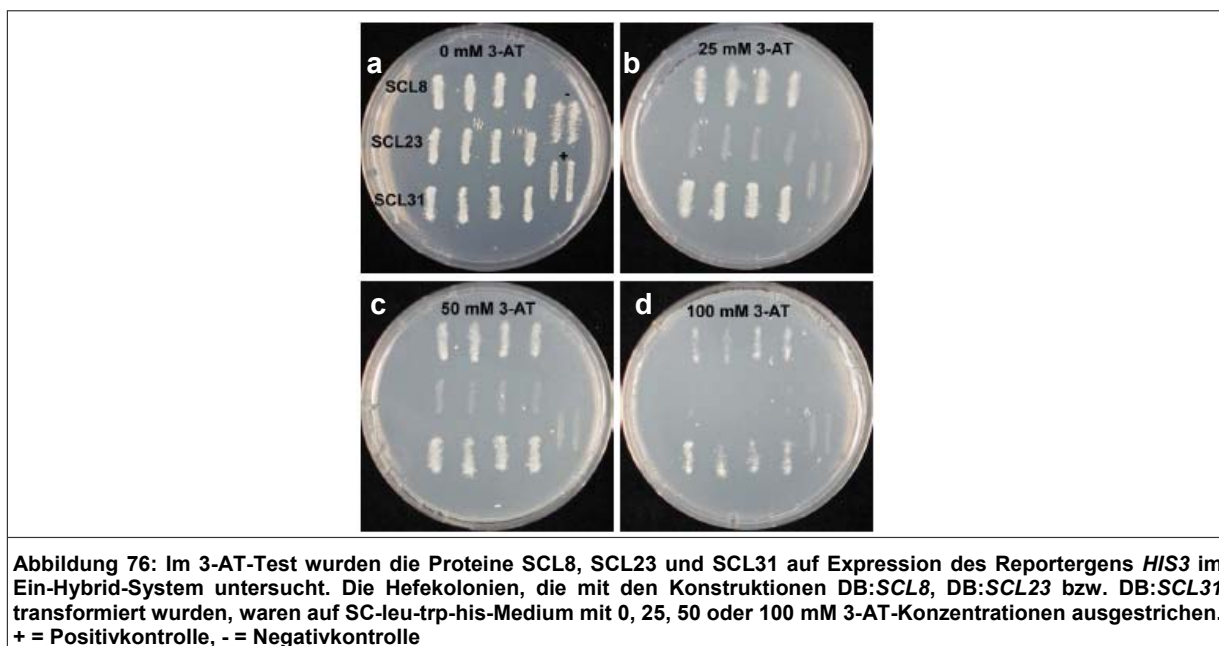
	<i>DB:SCL8</i>	<i>DB:SCL23</i>	<i>DB:SCL31</i>	pDB-LEU
<i>AD:SCL8</i>	+	-	+	-
<i>AD:SCL23</i>	+	-	+	-
<i>AD:SCL31</i>	+	-	+	-
pEXP-AD502	+	-	+	-
Aktivität des Reportergens : + nachgewiesen - nicht nachgewiesen				

Die Transaktivität von SCL8 und SCL31 sollte daher näher charakterisiert werden. Hierfür wurde das Zwei-Hybrid-System in ein „Ein-Hybrid-System“ modifiziert. Die jeweilige DB-Fusion wurde zusammen mit pEXP-AD502 in den MaV203 Hefestamm transformiert. Eine Ko-Transformation von pEXP-AD502 war notwendig, da dieser Vektor ebenso wie pDest22 das *TRP1* Gen enthält und die Hefezellen ohne ihn nicht in der Lage sind auf tryptophanfreiem Medium zu wachsen. Die Fusionsproteine DB:SCL8, DB:SCL23 und DB:SCL31 wurden im 3-AT-, X-Gal und im CPRG-Test bezüglich der Expression der Reportergene *HIS3* und β -GAL und so auf die Transaktivität des SCL8 und SCL31 Proteins getestet. Ein Hefestamm, der mit den Plasmiden pPC97-*Fos* und pPC86-*Jun* transformiert wurde, diente als Positivkontrolle. Die Gene *FOS* und *JUN* sind an die Aktivierungs- bzw. Bindungsdomäne in diesen beiden Plasmiden fusioniert. Die Negativkontrolle war ein Hefestamm, der mit den Kontrollplasmiden pDB-LEU und pEXP-AD502 transformiert wurde.

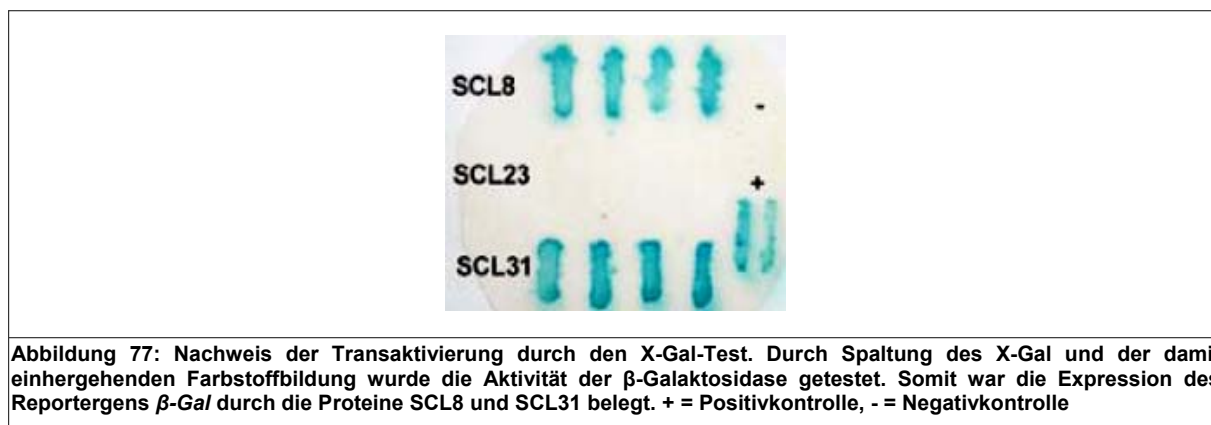
Bilden zwei Interaktionspartner des Zwei-Hybrid-Systems einen aktiven Transkriptionsfaktor oder besitzt eine Konstruktion im Ein-Hybrid-System eine transaktivierende Eigenschaft, werden große Mengen *HIS3* gebildet. Dadurch sind Zellen in Abwesenheit von Histidin in der Lage auf höheren 3-AT-Konzentrationen zu wachsen. Das 3-AT wirkt als kompetitiver Inhibitor für das *HIS3* Enzym. Das Reportergen *HIS3* kodiert für die Imidazol-Glycerin-Phosphat-Dehydratase, ein Enzym das in die Histidin-Biosynthese involviert ist. Dieses Enzym kann spezifisch durch 3-AT inhibiert werden. Der Hefestamm MaV203 exprimiert eine basale Menge an *HIS3*, doch das Enzym wird schon durch geringe 3-AT-Konzentrationen gehemmt. Bilden nun im Zwei-Hybrid-System zwei Interaktionspartner einen aktiven Transkriptionsfaktor, bzw. zeigt eine Konstruktion im Ein-Hybrid-System selbst transaktivierende Eigenschaften, so werden so große Mengen der Dehydratase gebildet, so dass die Zellen selbst in Abwesenheit von Histidin noch bei höheren 3-AT-Konzentrationen wachsen können.

Um die Aktivität des Reportergens *HIS3* und damit die Transaktivität der GRAS-Proteine SCL8, SCL23 und SCL31 zu testen, wurden die transformierten Hefen auf Histidin-freies, 3-AT-haltiges Medium transferiert. Für die Aufklärung der Transaktivität der GRAS-Proteine SCL8, SCL23 und SCL31, wurden die transformierten Hefen auf Histidin-freiem und 3-AT-haltigem Medium angezogen.

Alle drei Transformanten, die Negativ- und die Positivkontrolle waren in der Lage ohne Zusatz von 3-AT auf dem Medium zu wachsen (Abb. 76a). Eine Konzentration von 25 mM 3-AT führte zu deutlicher Wachstumsreduktion der Negativkontrolle und der SCL23-Transformanden (Abb. 76b). Eine Konzentration bis zu 50 mM 3-AT führte zu einer wesentlichen Einschränkung des Wachstums von DB:SCL23-Klonen (Abb. 76c). Die Negativkontrolle war nicht in der Lage auf 50 mM 3-AT Kolonien auszubilden (Abb. 76c). Hefekolonien der Konstruktionen DB:SCL8 und DB:SCL31 sowie die Positivkontrolle waren in der Lage bis 50 mM 3-AT uneingeschränkt zu wachsen. Ab einer Konzentration von 100 mM 3-AT war das Wachstum von DB:SCL23 Kolonien völlig gehemmt, während es bei DB:SCL8 und DB:SCL31 Hefekolonien nur zu einer leichten Wachstumsreduktion kam (Abb. 76d).

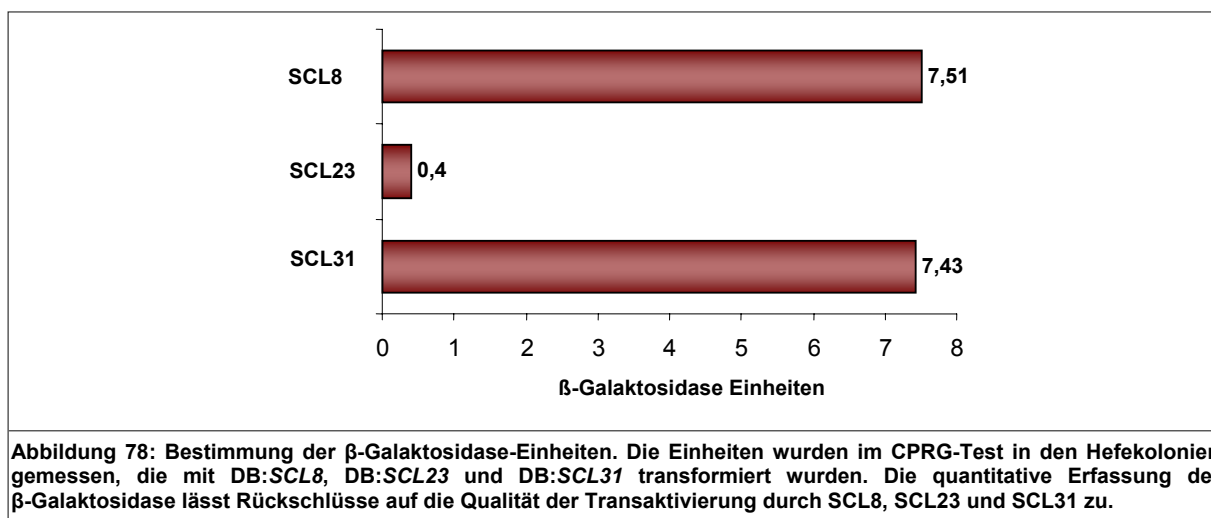


Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe des X-GAL-Tests gestützt. Wie aus Abbildung 77 zu entnehmen, exprimierten die Kolonien mit den Konstruktionen DB:SCL8 und DB:SCL31, sowie die Positivkontrolle β -GALAKTOSIDASE (Abb. 77). Nach 24-stündiger Inkubation färbten sich die Kolonien blau. Die Konstruktion DB:SCL23 und die Negativkontrolle entwickelten kein Signal (Abb. 77).



In einem weiteren Versuch sollte die β -Galaktosidaseaktivität zusätzlich quantifiziert werden (Abb. 78). Der CPRG-Test ermöglicht es, durch die einzelnen Konstruktionen eventuelle Unterschiede in der Intensität der Transaktivierung zu ermitteln. Bei der Substanz CPRG handelt es sich um ein Laktose-Analogon, ähnlich dem X-Gal. Bei seiner Spaltung entsteht ein Farbstoff, der photometrisch detektiert werden kann (Simon et al. 1987).

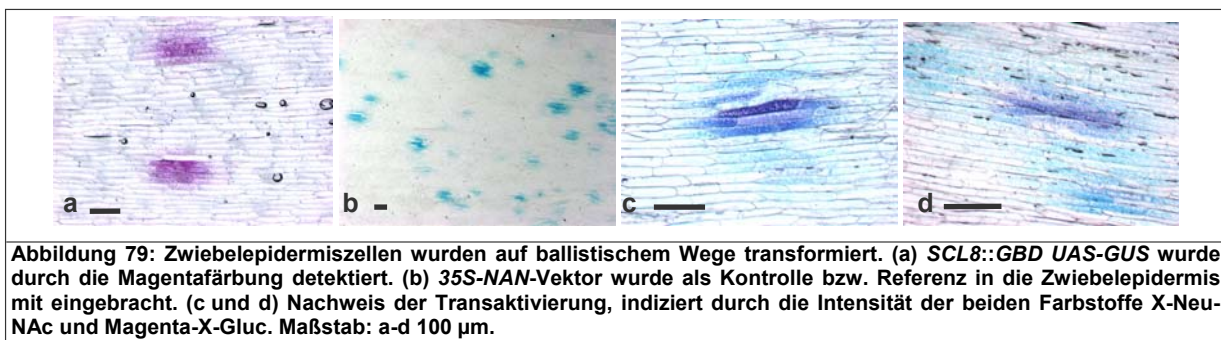
Die Quantität der β -Galaktosidaseaktivität im CPRG-Test wurde in β -Galaktosidase-Einheiten erfasst (Abb. 78). Die β -Galaktosidase-Einheiten lassen Rückschlüsse auf die Expressionsrate von β -Gal zu. Auf diese Weise können Unterschiede in der Qualität der Transaktivierung einzelner Klone nachgewiesen werden. Wie schon im X-Gal-Test, konnte im CPRG-Test die Aktivität des Reportergens β -Gal in den Hefekolonien DB:SCL8 und DB:SCL31 nachgewiesen werden. In den Kolonien der Konstruktionen DB:SCL8 und DB:SCL31 wurde im CPRG-Test eine β -Galaktosidase-Menge von etwa 7,5 Einheiten ermittelt (Abb. 78). Wie schon im β -Galaktosidase Test, konnte auch hier bis auf eine geringe Hintergrundaktivität von 0,4 Einheiten keine Expression des Klons DB:SCL23 detektiert werden (Abb. 78).



Diese drei unabhängigen Versuche des Ein-Hybrid-Systems wiesen die Expression der Reportergene durch *SCL8* und *SCL31* nach. Beide Proteine können mit dem Transkriptions-Initiationskomplex in Wechselwirkung treten. Dem Protein *SCL23* kann aufgrund der Ergebnisse keine transaktivierende Eigenschaft zugeschrieben werden (Abb. 78).

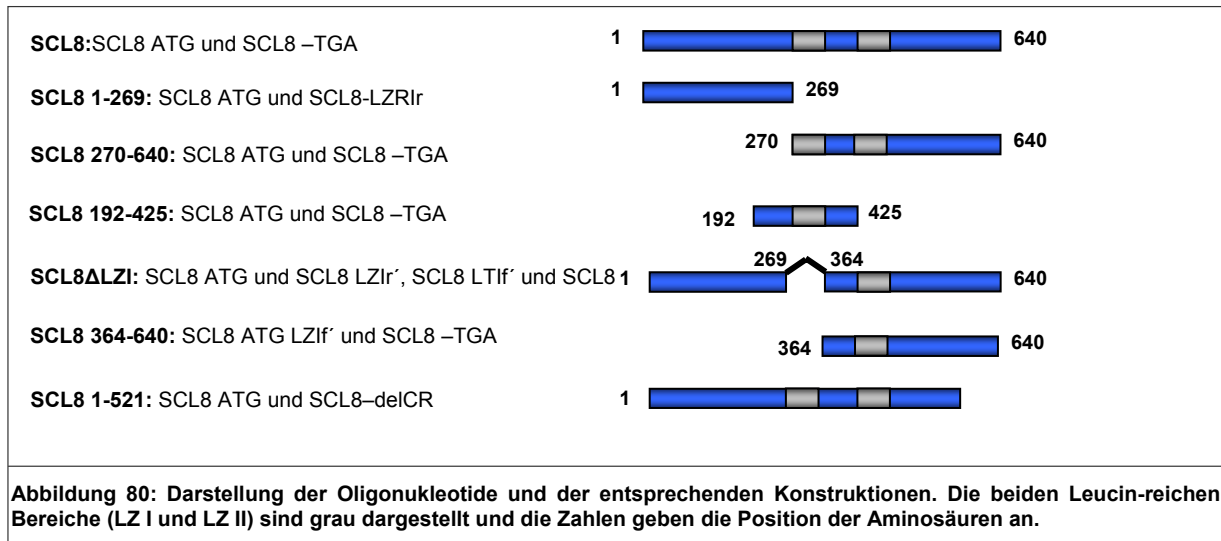
3.8.2 *In vivo* Transaktivierung

Nachdem die Transaktivierung durch das Zwei-Hybrid-System nachgewiesen worden war, sollte in einem weiteren Versuch die Transaktivierung von *SCL8* *in vivo* bestätigt werden. Die Sequenz des *SCL8* Gens wurde mit Hilfe des „Eingangs-Vektors“ in den jeweiligen „Ziel-Vektor“ kloniert. Die Ziel-Vektoren besitzen eine GAL4 DNS-Bindedomäne mit der das Gen fusioniert wird. Die Bindung erfolgt an GAL4-*UAS-GUS*. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Transformation wurde der *35S-NAN*-Vektor (Kirby et al. 2000) eingesetzt. Im Anschluß wurden die drei Vektoren auf ballistischem Wege mit Hilfe einer „DNS-Partikel-Kanone“ in Zwiebelepidermiszellen transferiert. *NAN*-Aktivität wurde dabei durch den blauen Farbstoff X-Neu-NAc visualisiert. *GUS* Aktivität wurde durch X-Gluc-M indiziert. Dieser Versuch bestätigte die Transaktivierung des *SCL8* Proteins *in vivo*, indiziert durch das Verhältnis und die Intensität der Farbstoffe (Abb. 79).

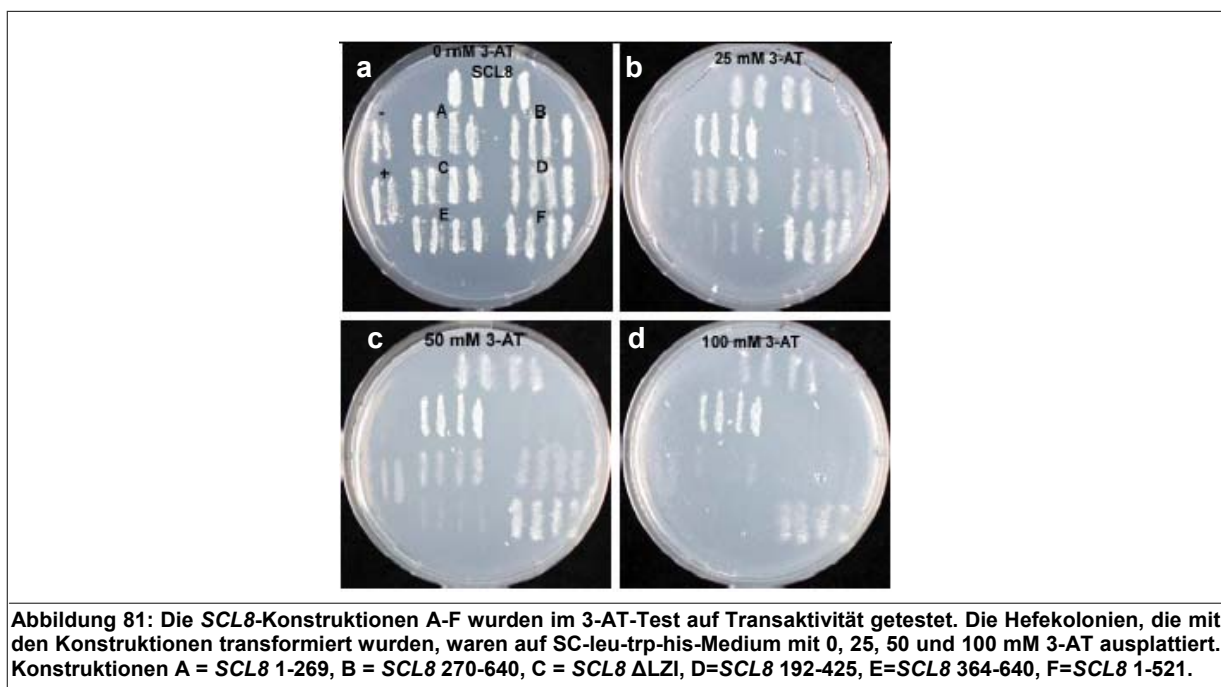


3.8.3. Eingrenzung der transaktivierenden Domäne von *SCL8*

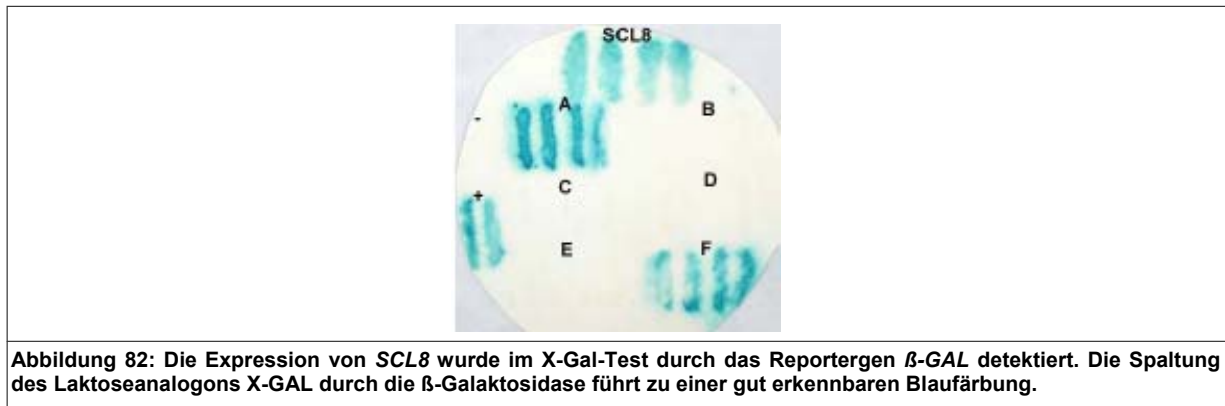
Die transaktivierende Domäne von *SCL8* sollte näher charakterisiert werden. Dafür wurden große Domänen von *SCL8* deletiert und die Konstruktionen im Ein-Hybrid-System in Bezug auf Transaktivität getestet. Diese Konstruktionen wurden mit Hilfe der hier genannten Oligonukleotide in einer PCR-Reaktion amplifiziert (Abb. 80). Für die Herstellung des *SCL8:ΔLZI*-Konstruktion war es nötig, die erste Leucin-reiche Domäne zu deletieren. Hierfür wurden das N-terminale und das C-terminale Fragment mittels PCR amplifiziert. Durch die Oligonukleotide „*SCL8-LZI r*“ und „*SCL8-LZI f*“ konnte sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende eine *Xba I* Schnittstelle eingebracht werden.



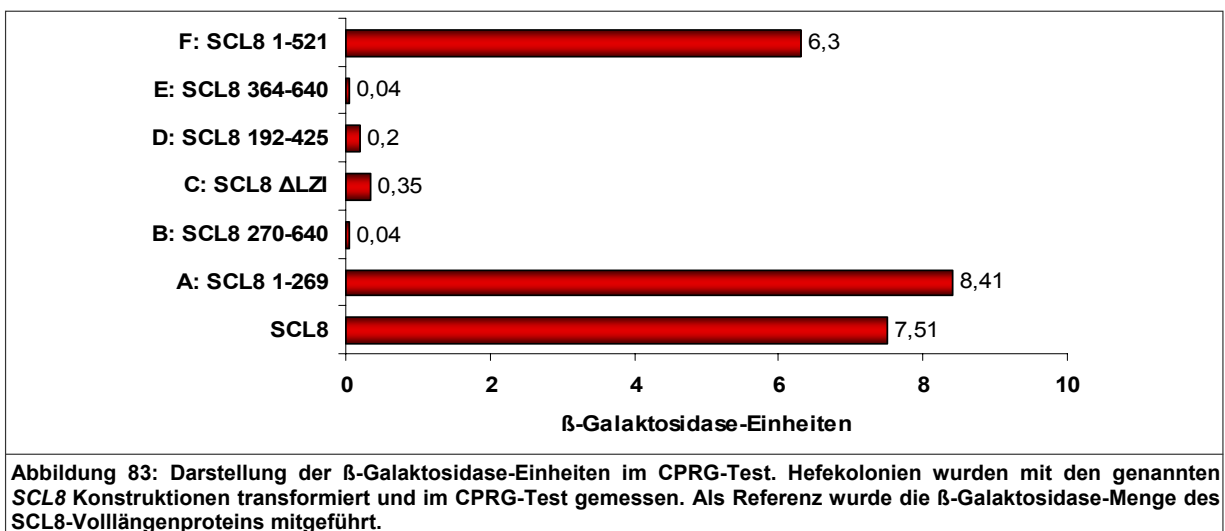
Solche Hefekolonien, die das SCL8-Volllängenprotein enthielten, konnten bis 100 mM 3-AT beinahe uneingeschränkt wachsen. Sowohl die Positivkontrolle als auch die Konstruktionen SCL8 1-269 (A) und SCL8 1-521 (B) konnten bis zu einer Konzentration 100 mM 3-AT Kolonien bilden (Abb. 83d). Die Kolonien mit SCL8 bzw. mit der Konstruktion SCL8 1-521 (F) waren deutlicher gehemmt als die Kolonien mit der Konstruktion (SCL8 1-269) (D). Die Kolonien der Konstruktionen SCL8 270-640 (B), SCL8 ΔLZI (C), SCL8 192-425 (D) und SCL8 364-640 (Abb. 81e), sowie die Negativkontrolle waren bei 100 mM 3-AT nicht mehr in der Lage zu wachsen (Abb. 81d). Zellen, die die Konstruktion SCL8 270-640 (B) und SCL8 364-640 (E) enthielten, waren schon ab einer Konzentration von 25 mM 3-AT in ihrer Entwicklung gehemmt (Abb. 81b).



Die Kolonien wurden auf einen mit X-GAL-Lösung getränkten Filter gegeben. Kolonien der Transformanten indizierten dabei deutliche Blaufärbung. Im Gegensatz dazu konnte die Expression von β -Gal in den Klonen SCL8 270-640 (Abb. 82B), SCL8 Δ LZI (Abb. 82C), SCL8 192-425 (Abb. 82D) und SCL8 364-640 (Abb. 82E) nicht nachgewiesen werden.



Im CPRG-Test wurden die Klone untersucht, die oben genannte Konstruktionen trugen. Hierbei wurden die Ergebnisse des X-Gal-Tests bestätigt (Abb. 83). Die Konstruktionen der Klone SCL8 270-640 (B), SCL8 Δ LZI (C), SCL8 192-425 (D) und SCL8 364-640 (E) indizierten kein Signal. Die Klone SCL8 Δ LZI (C) und SCL8 192-425 (D) entwickelten eine schwache Hintergrundaktivität. Vergleicht man die Klone SCL8 1-269 (A) (Abb. 83) mit hoher Aktivität und SCL8 192-425 (D) mit sehr geringer Aktivität wird deutlich, dass es scheinbar wichtig ist, dass die Konstruktion die ersten 191 Aminosäuren trägt. Das ist der Bereich, in dem sich vermutlich auch die Kernlokalisierungssequenz befindet. Die gesuchte Sequenz scheint sich also im nicht konservierten N-terminalen Teil des Proteins zu befinden.



Für den Nachweis der Transaktivierung von Proteinen wurden die Proteinsequenzen der Proteine SCL8, 23 und 31 verglichen. Für die Transaktivierung von Proteinen können saure Aminosäuren verantwortlich sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine vergleichende Sequenzanalyse durchgeführt, die Aufschluss über diese Aminosäuren geben sollte. Aufgrund der Gemeinsamkeit im Hinblick auf die Transaktivierung von SCL8 und SCL31 konnte erwartet werden, dass sich in deren Sequenzen bestimmte Domänen finden, die bei SCL23 nicht zu finden sind. Dieser Sequenzvergleich wurde mittels eines „Alignment“-Programms MegAlign (DNA-Star) durchgeführt. Die Analyse verdeutlichte, dass das Protein SCL23 einen wesentlich kürzeren N-Terminus trägt als die Proteine SCL8 und SCL31. Das Protein SCL23 besteht fast nur aus dem konservierten C-Terminus, der allen GRAS-Proteinen gemeinsam ist (Abb. 2). Daher ist es nicht überraschend, dass SCL23 keine transaktivierenden Eigenschaften besitzt.

Der Vergleich transaktivierender Fragmente zeigte, dass in den Proteinen SCL8 und SCL31 die jeweiligen Abschnitte eine Anhäufung saurer Aminosäuren aufweisen. Diese sind jedoch weder in ihrer Art noch in ihrer Position der Aminosäure konserviert. Das Protein SCL 8 enthält überwiegend die Aminosäure Aspartatsäure, in SCL31 findet sich vor allem Glutamat als saure Aminosäure. Saure Aminosäurereste fördern die Transkription in eukaryotischen Zellen. Durch diese Aminosäure wird die Assemblierung beteiligter Faktoren zu einer Transkriptionsmaschinerie am Promotor unterstützt und beschleunigt. Außerdem werden die Faktoren TFIIB und TFIID für die Transkription rekrutiert (Kays et al. 2000). Die Analyse der Aminosäuresequenzen lässt vermuten, dass in den N-Termini von SCL8 und SCL31 transaktivierende Domänen lokalisiert sind.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Proteine SCL8, 23 und 31

Die Mutagenese durch T-DNS-Insertion oder Transposon, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, ist ein „Werkzeug“ der reversen Genetik und dient zur Einbringung von Mutationen. Bei der Insertion von Fremd-DNS kommt es zur Unterbrechung des ORF (=open reading frame). Zusammen mit der Insertion können Selektionsmarker eingebracht werden. Für die Charakterisierung der Proteine SCL8, SCL23 und SCL31 wurden Insertionslinien und Überexpressionslinien isoliert und deren Phänotypen mit Hilfe physiologischer Versuche analysiert. Die Insertionen waren entweder im regulatorischen Bereich des Promotors (*sc/23-1*) oder im kodierenden Bereich (*sc/8-1*, *sc/8-2*, *sc/8-3*, *sc/23-2*, *sc/31-1* und *sc/31-2*) lokalisiert. Die Analyse von Mutanten bietet die Möglichkeit den Einfluss eines spezifischen Gens zu untersuchen und daraus auf seine Funktion zu schließen.

Nur wenige der Proteine finden sich außerhalb dieser Unterfamilien. Zu diesen Ausnahmen gehört das Protein SCL8. Der PAT1-Zweig, dessen Mitglieder in die Lichtsignaltransduktion involviert sind, ist dem Protein noch am nächsten. Zunächst war die Frage interessant, ob SCL8 ebenfalls für die Lichtsignalweiterleitung wichtig ist oder vielleicht eine völlig andere Funktion hat. Das Protein SCL23 befindet sich zusammen mit SCL3 und SCR im „SCR-Zweig“. Das Protein SCR ist in die Musterbildung der Wurzel involviert (DiLaurenzio et al. 1996). Die Seitensprosse der *scr* Mutante reagieren hyposensitiv auf Gravitropismus. Das Interessante an SCL23 ist die phylogenetische Nähe zu SCR und die Frage, ob damit auch eine funktionelle Nähe einhergeht. Das Protein SCL31 ist dem „SCL9-Zweig“ zugeordnet, über den bisher so gut wie nichts bekannt ist. Da in mehreren Fällen gezeigt werden konnte, dass Mitglieder einer Unterfamilie funktionell zusammengefasst werden können, kann die Charakterisierung eines der Proteine aus einem Zweig ein Indiz für die Funktionen der anderen sieben Proteine einer Unterfamilie sein.

4.1.1 Phänotyp der *sc/8* Mutante und der Überexpressionslinie 35S::*SCL8*

Die Entwicklung einer Pflanze wird zunächst, ausgehend von zwei Meristemen, dem Sprossmeristem und dem Wurzelmeristem, reguliert. Das apikale SAM ist am Sprossapex lokalisiert. Weitere sekundäre Meristeme finden sich in den Blattachsen, die sich wahrscheinlich aus dem apikalen Meristem ableiten. Etwa 30% der Keimlinge der *sc/8-1* Mutanten und 20% der *sc/8-2* Mutanten waren im Alter von ein bis zwei Tagen in ihrer Entwicklung arretiert und entwickelten kein funktionsfähiges SAM und RAM (Abschnitt 3.4.1.1). Diese Keimlinge konnten sich auch zu keinem späteren Zeitpunkt über dieses Stadium hinaus entwickeln. Erste mikroskopische Analysen wiesen darauf hin, dass die apikalen Meristeme des Sprosses und der Wurzel nicht oder nur rudimentär entwickelt waren, ähnlich den starken Phänotypen der Mutanten *mp* und *bdl*.

Die beiden Mutanten sind bereits in der frühen Embryogenese innerhalb des Auxinsignalwegs gestört (Hardtke et al. 1998 und 2004, Hamann et al. 2002). Der Phänotyp der wachstumsarretierten *sc/8* Keimlinge führte zu dem Schluss, dass das Protein SCL8 unter anderem für die Bildung basaler Pflanzenstrukturen, wie Hypokotyl und Wurzelmeristem wichtig ist. *SCL8* scheint nicht allein für die korrekte Ausbildung der embryonalen Musterbildung verantwortlich zu sein, da nicht alle homozygoten *sc/8* Mutanten diesen starken Phänotyp zeigten. Daraus leitet sich die Frage nach den Ursachen der Fehlregulation ab. Ein wichtiger Parameter in der Entwicklung der Meristeme ist die Kontrolle durch Hormone, insbesondere durch Auxin.

Mutanten die nicht in ihrem Wachstum arretiert waren, entwickelten sich vermeintlich „normal“ und zeigten erst im Alter von acht Wochen Veränderungen in der Phyllotaxis und Meristemdifferenzierung (Abschnitt 3.4.1.1). Diese Mutanten zeigten im Laufe ihrer Lebensspanne auch signifikant längere Primärwurzeln als der Wildtyp (Abschnitt 3.4.1.3). Zusätzlich ist die höhere Anzahl an Lateralwurzeln ein Hinweis darauf, dass SCL8 in die Regulation des Wurzelmeristems involviert ist. Die Expressionsmuster von *SCL8* an den Initiationspunkten der Wurzeln und in den Wachstumszonen der Primärwurzel stützten diese Ergebnisse (Abschnitt 3.1.1.1). Aus den Microarraydaten konnte entnommen werden, dass eine hohe Konzentration an *SCL8* mRNA besonders nach Inkubation auf ABA zu finden war (Abschnitt 3.1.1.1.1). Aufgrund dieser Daten wurde der Einfluss von ABA auf SCL8 näher untersucht. Ein Vergleich der histologischen Expression von Keimlingen, die sich auf ABA entwickelten und Keimlingen, die ohne ABA wuchsen, machte deutlich, dass Keimlinge unter ABA Einfluss GUS-Färbung ausschließlich in den Wurzelspitzen zeigten. Vermutlich ist ABA ein Aktivator von *SCL8* in der Wurzelspitze der Primärwurzel während der Entwicklung von Keimlingen. In älteren Keimlingen konnte sowohl in den Wurzelspitzen als auch am Übergang zwischen Hypokotyl und Wurzelspitze Blaufärbung detektiert werden (Abschnitt 3.1.1.1.1).

Ein Zusammenhang zwischen entwicklungsrelevanten Prozessen und Phytohormonen wurde bereits in vielen Arbeiten bestätigt (Hamann et al. 1999, Arenas-Huertero et al. 2000, Collett et al. 2000, Chatfield et al. 2000, Friml et al. 2003, Bennett et al. 2006, Kuhlemeier et al. 2007). Für die DELLA-Proteine, einer anderen Untergruppe der GRAS Proteine, konnte dies im Zusammenhang mit den Phytohormonen Gibberellin und Ethylen gezeigt werden (Dill et al. 2001, Itoh et al. 2005, Willige et al. 2007). Die Mutanten *sc/8-1* und *sc/8-2* reagierten bei der Entwicklung von Seitenwurzeln hypersensitiv auf Auxin und entwickelten deutlich mehr Seitenwurzeln. Die Überexpressionsline *35S::SCL8* reagierten hingegen hyposensitiv auf Auxin.

Die Entwicklung von Kalli aus Hypokotyl- und Wurzelfragmenten von *sc/8* Mutanten und der Überexpressionslinie 35S::*SCL8* auf kallusinduzierenden Medium war ein weiteres Indiz für die Rolle von *SCL8* im Auxinsignalweg. Das kallusinduzierende Medium enthielt die Hormone Auxin und Cytokinin. Cytokinin allein schien aber keinen Einfluss auf *sc/8* Mutanten und die Überexpressionslinie zu haben. Durch eine höhere Sensitivität zu Auxin entwickelte sich ein größerer Kallus der Mutanten und Überexpressionslinien auf kallusinduzierendem Medium, verglichen mit dem Wildtyp.

Die Analyse der Expressionsmuster und des Phänotyps ließen den Schluss zu, dass *SCL8* sowohl in meristematischen Geweben als auch in entwicklungsrelevanten Prozessen exprimiert wird und *SCL8* somit an der Entwicklung der Pflanzenarchitektur beteiligt sein muss. Ein messbarer Effekt war das Auswachsen sekundärer und tertiärer Knospen aus den Achseln der Kaulinblätter in der Überexpressionslinie, während der Wildtyp nur einen Seitentrieb je Blattachsel hervorbrachte. In den Mutanten und Überexpressionslinien wurde die spirale Anordnung der Kaulinblätter durch eine teilweise gegenüberstehende bzw. quirlständige Anordnung abgelöst (Abschnitt 3.4.1.5). Sowohl die Überexpressionslinien, als auch die Mutante zeigten mehr Seitentriebe als der Wildtyp. In den lateralen Meristemen konnte die Expression von *SCL8* nachgewiesen werden (Abschnitt 3.1.1.1).

In der Literatur sind mehrere Mutanten beschrieben, die ebenfalls ein verändertes Verzweigungsmuster aufweisen. In der Regel sind die entsprechenden Proteine in die Signalwege verschiedener Hormone integriert. Die Proteine AXR1 (Lincoln et al. 1990, Leyser et al. 1993) und AUXIN RESPONSE FAKTOR 2 (=ARF2) (Liscum et al. 2002, Okushima et al. 2005) sind für den Auxinsignalweg wichtig. MAX1, MAX3 und MAX4 synthetisieren ein bisher nicht identifiziertes „longdistance Signal“, das wiederum MAX2 reguliert (Abb. 84). Nach Booker et al. (2005) handelt es sich bei diesem Signal um ein Karotinoid-Derivat. Das *MAX2*-Gen kodiert für ein F-Box Protein, dass als möglicher Regulator sowohl für die Seneszens als auch für die Verzweigung beschrieben wurde (Stirnberg et al. 2002). Die Mutanten *axr1*, *max1*, *max3* und *max4* entwickeln, ebenso wie die Überexpressionslinie 35S::*SCL* mehr als einen Seitentrieb pro Blattachsel.

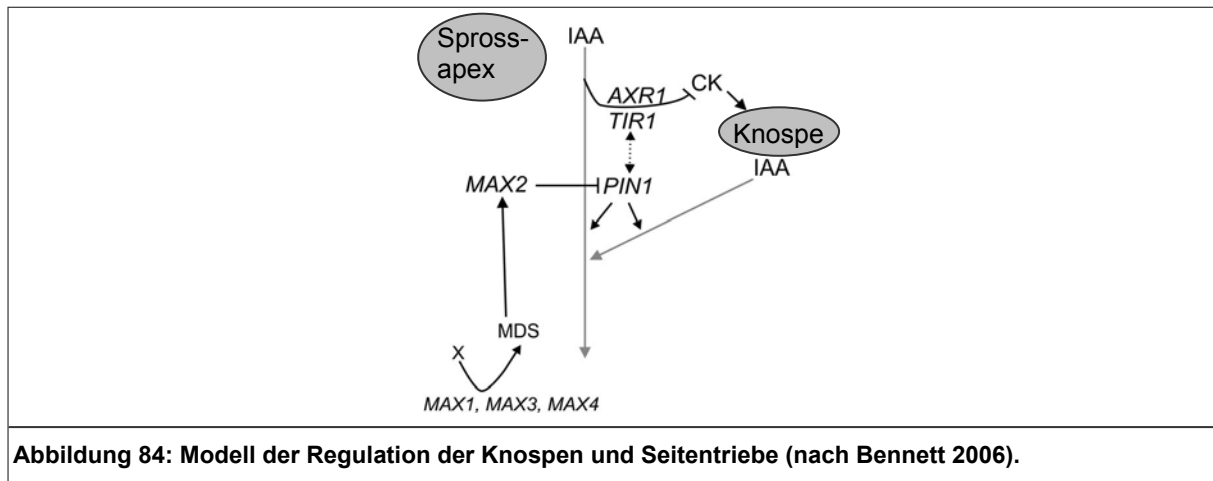


Abbildung 84: Modell der Regulation der Knospen und Seitentriebe (nach Bennett 2006).

Die physiologische Charakterisierung und der Vergleich zwischen *sc/8* und *35S::SCL8* führten zu dem Schluss, dass sich die beiden Linien bezüglich ihres Verzweigungsmuster ähneln. Möglicherweise führt eine erhöhte Konzentration des SCL8 Proteins in der Überexpressionslinie zu einer Rückkopplung innerhalb der Signaltransduktion, was dazu führt, dass der Signaltransduktionsweg nicht weiter funktioniert und so zu einem ähnlichen Phänotyp wie er in der Mutante *sc/8* führt. Detaillierte Analysen werden weiteren Aufschluss über die molekularen Mechanismen von SCL8 und dessen Einfluss auf die Verzweigung von Pflanzen geben. Hierzu gehört unter anderem das Auffinden von Interaktionspartnern, sowie weitere Untersuchungen durch exogene Hormonapplikationen (wie z. B. Auxin, ABA und Cytokinin). Die Untersuchungen, in welcher Weise SCL8 in die Prozesse der frühen Entwicklungsstadien des Embryos, als auch in den adulten Pflanzen und in seneszenten Organen der Pflanze involviert ist, stehen erst am Anfang. Sie lassen jedoch den Schluss zu, dass SCL8 in den Auxinsignalweg involviert ist.

Apikale Dominanz ist ein Mechanismus, der das Auswachsen der lateralen Knospen in ihrer Anzahl und ihrer Länge kontrolliert (Thimann und Skoog 1934). Der Hauptspross überwächst die Seitensprosse und gleichzeitig hemmt der Hauptspross über seine Auxinkonzentration das Auswachsen weiterer Seitentriebe. Die Überexpressionslinien *35S::SCL8* zeigte im Gegensatz zu den „knock-out“ Mutanten den Verlust der apikalen Dominanz. Die Mutanten *sc/8-2* und *sc/8-3*, deren Haupttriebe dekapitiert wurden (Abschnitt 3.4.1.14), hatten signifikant weniger Seitentriebe im Vergleich zum Wildtyp, unabhängig davon ob den dekapitierten Enden NAA-haltige Paste appliziert wurde oder nicht. Möglicherweise ist eine weitere Determinante oder Substanz dafür ursächlich. Nicht das Auxin, sondern ein anderes, bisher unbekanntes Signal wandert in die lateralen Knospen. Es ist vermutlich in die Repression der lateralen Seitentriebe involviert (Booker et al. 2005).

Versuche haben gezeigt, dass *SCL8* dort stärker exprimiert wird, wo auch Auxin produziert wird. Das konnte nachgewiesen werden in Blüten, Seitenmeristemen, Stipulä, den Blattspitzen, sowie in den Wurzelverzweigungen und der Wachstumszone der Wurzel.

Das ist ein Hinweis darauf, dass SCL8 eine Rolle in verschiedenen Auxin-regulierten Prozessen spielt (Xia et al. 2003). Die erhöhte Anzahl der Seitentriebe sowohl in der Überexpressionslinie als auch in den Mutanten lassen vermuten, dass SCL8 eine wichtige Rolle in der Initiation der axillären Meristeme und dem Auswachsen der Knospen, vermutlich innerhalb des Auxinsignalwegs, spielen muß.

In der Überexpressionslinie waren 25% der Schoten kleiner und infertil. Es gibt Untersuchungen, die darauf hindeuten, dass Auxinderivate auch an der Entwicklung der Schoten beteiligt sind (Vivian-Smith et al. 2003). Das Expressionsmuster von SCL8 (Abschnitt 3.4.1.13) und die Entwicklung infertiler Schoten in der Überexpressionslinie machte deutlich, dass SCL8 auch in der Entwicklung von Schoten eine Rolle spielt. In Abschnitt 3.4.1.1 wurde schon darauf eingegangen, dass SCL8 bereits an der Entwicklung von *Arabidopsis* Embryos beteiligt sein könnte und auf diesem Weg vermutlich eine Rolle in der Fruchtentwicklung spielt. Allein die Applikation von Auxin führt auch ohne vorangegangene Fertilisation zur Fruchtentwicklung. Dieser Mechanismus wird als Parthenokarpie bezeichnet (Vivian-Smith et al. 1999). Goetz et al. konnten im Jahr 2006 zeigen, dass Parthenokarpie durch verschiedene Veränderungen innerhalb des Auxin-Signalwegs erreicht werden kann.

Entsprechend dem Phänotyp der *sc/8* Mutante entwickeln auch *auxin response factor8* (=arf8) Mutanten Schoten, die keine Samen enthalten (Goetz et al. 2006). In den Samenanlagen finden sich Auxin, Ethylen und ABA. Diese Phytohormone scheinen eine Rolle in der Samen- und Fruchtentwicklung zu spielen (Nitsch et al. 1970, Talon et al. 1990, Vivian-Smith et al. 1990, Swain et al. 1997). Es wurden erhöhte Konzentrationen an Auxinen, Ethylen und ABA in parthenokarpen Früchten gefunden (Talon et al. 1992). Die Aufklärung der Mechanismen, die zur Initiation von Samen und Schoten führen stehen noch am Anfang. Besonders interessant ist die Aufklärung der zeitliche Determination, die die Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt dazu anregt Schoten zu entwickeln.

Der deutlichste Phänotyp der Mutante *sc/8* war die Entwicklung von Hochrosetten adulter Pflanzen im Alter von acht Wochen aus den axillären Meristemen (Abschnitt 3.4.1.8). Pflanzen, die sich bereits in der reproduktiven Phase befanden, kehrten partiell in die vegetative Phase zurück, was beim Wildtyp nicht beobachtet werden konnte. Im Wildtyp findet ein Übergang von einer vegetativen zu einer reproduktiven Phase statt. Das ist vergleichbar mit der Pubertät des Menschen, die das Kind zum „reproduktiven“ Erwachsenen macht. In Überexpressionslinien konnte die Entwicklung partieller Hochrosetten, bestehend aus drei Blättern, nachgewiesen werden (Abschnitt 3.4.1.9). Daher scheint das Protein SCL8 eine Rolle in der Regulation der Transition zu spielen.

In der Literatur finden sich einige Mutanten und Ökotypen von *Arabidopsis thaliana*, die Hochrosetten entwickeln z. B. CULLIN-ASSOCIATED AND NEDDYLATION-DISSOCIATED (= *cand1-1*) (Feng et al. 2004), AERIAL ROSETTE1 (= *art-1*) (Grbic et al. 1996) ENHANCER OF AERIAL ROSETTE1 (= *ear1*) und die Ökotypen Sy-0 und Cha-0 (Grbic et al. 1996). Als Referenz zu *sc18* wurden hierbei die Hochrosetten des Wildtyps Sy-0 herangezogen, die im Vergleich zu *sc18* aber zusätzlich einen kleinen Stiel ausbildet auf dem sich dann die Hochrosette entwickelt.

Die Transition legt den Zeitpunkt der Meristem-Identifikation fest. Über die Signale, die die Aktivität der Gene kontrollieren, die in die Transition involviert sind, ist noch wenig bekannt (Okamura et al. 1993). Die Anzahl der Hochrosetten an *sc18* Mutanten ist nicht einheitlich, sondern schwankt zwischen 1-10 Hochrosetten. Ein Grund für die unterschiedlich starke Ausprägung des Phänotyps könnte sein, dass die Entwicklung der Hochrosetten noch durch eine weitere Determinante induziert wird. Es ist auch vorstellbar, dass das Methylierungsmuster der Gene hier eine wichtige Rolle spielt. Ein Hinweis dafür fand sich z. B. in der Kreuzung der *sc18/DR5::GUS* Mutante, die in der ersten homozygoten Generation eine hohe Zahl an Hochrosetten entwickelte.

Im Zusammenhang mit dem Phasenübergang wurde auch der Blühzeitpunkt der Mutanten *sc18-2*, *sc18-3* und der Überexpressionslinie 35S::*SCL8* untersucht. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Transkriptionsrate der Blühinduktoren *CO*, *FT* und *SOC* verändert sind. *Arabidopsis* Langtag-Ökotypen blühen im Langtag (12-16h Licht) schneller als im Kurztag (8h Licht). Schon ein einziger Tag mit verlängerter Lichtphase ist in der Lage die Blütenbildung zu initiieren (Corbesier et al. 2007). Pflanzen mit Mutationen in Genen, die als positive Regulatoren im „photoperiodischen Signalweg“ aktiv sind, können daran erkannt werden, dass sie im Langtag später blühen, der Blühzeitpunkt im Kurztag aber unbeeinflusst bleibt. Die verzögerte Blühzeit der Mutanten, wie auch der Überexpressionslinie, könnte direkt durch den veränderten Zeitpunkt für die Transitions verursacht werden. Vermutlich ist *SCL8* auch an der Regulierung der Blühzeit beteiligt. Aufschluß darüber könnten Versuche unter verschiedenen Lichteinwirkungen, sowie unter Einwirkung von Hormonen Auxin oder ABA erbracht werden.

4.1.1.1 Expression von *SCL8* und Auxinakkumulation

Um zu verstehen in welcher Weise *SCL8* an der Initiation des axillären Meristems und der Verzweigung mitwirkt, wurde die räumliche und zeitliche Akkumulation von Auxin durch GUS-Färbung in adulten *Arabidopsis* Pflanzen untersucht. Mit Hilfe von Pflanzen, die ein sogenanntes DR5-Element enthalten, kann die endogene Auxinkonzentration analysiert werden (Ulmasov et al. 1997).

Auxin aktiviert über das DR5 Element das *GUS* Reportergen, wodurch das Phytohormon indirekt nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden Pflanzen, mit dem DR5-Element und einem daran gekoppelten *GUS*-Reportergen mit „knock-out“ Mutanten der Linie *sc/8-2* gekreuzt. *GUS*-Färbung konnte in DR5-Pflanzen in den Stängeln und den Achseln der Tragblätter nachgewiesen werden, sowie marginal in den Rosettenblättern. Eine starke Färbung fand sich auch in den Stylen und den Abszissionsstellen der Schoten. Dem gegenüber zeigte sich in der *sc/8/DR5::GUS* Linie kaum Färbung in Knospen und Kaulinblätter.

Der deutlichste Unterschied zwischen den beiden Linien konnte bei der Auxinakkumulation in den Rosettenblättern sowie den Petiolen nachgewiesen werden. Die Färbung der Wurzeln war gleichermaßen stark in beiden Linien. In *Arabidopsis* wird die Initiation der axillären Seitentriebe vermutlich durch den Auxingehalt des Sprossapexes reguliert. Dieser Versuch müsste mit einer *SCL8* Überexpressionslinie, die ein DR5-Reporterelement enthält, wiederholt werden, um Erkenntnisse über deren Auxinstatus zu gewinnen. Der Unterschied zwischen den Expressionsmustern von *sc/8/DR5::GUS* und *DR5::GUS* Linien, und somit die Verteilung von Auxin in der Pflanze waren weniger stark als zunächst erwartet. Ein Vergleich der Expressionsmuster von DR5-Reporter Linien und *sc/8/DR5::GUS* Linien zeigte, dass sich die beiden Linien in ihrem Expressionsmuster kaum unterschieden (Abschnitt 3.4.1.16). Eine mögliche Erklärung ist, dass das DR5-Element nicht sensitiv genug ist um schon geringe Unterschiede in der Auxinakkumulation zu detektieren. Eine andere Erklärung wäre, dass *SCL8* stromabwärts von Auxin wirkt und somit eine Veränderung im Expressionsmuster nicht zu erwarten ist.

4.1.2 Phänotyp der Mutante *sc/31* und der Überexpressionslinie *35S::SCL31*

Durch phänotypische Untersuchungen wurde deutlich, dass sowohl *SCL31* als auch *SCL8* Einfluss auf verschiedenste Aspekte der Pflanzenarchitektur haben. Es konnte gezeigt werden, dass *sc/31* Mutanten eine geringere Anzahl an Seitenwurzeln entwickelten. Im Gegensatz dazu hatte die Überexpressionslinie deutlich mehr Seitenwurzeln gebildet. Dieser Phänotyp wurde durch die Expressionsmuster gestützt, sowohl durch *GUS*-Färbung (Abschnitt 3.1.1.3) als auch durch die Microarray-Daten (Abschnitt 3.1.2.3). Die *GUS*-Färbung ließ sich bereits in den Seitenwurzel-Primordien des Perizykels nachweisen und wuchs mit der dahinter liegenden Elongationszone aus der „elterlichen“ Wurzel heraus. Durch diese Ergebnisse ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen *SCL31* und der Wurzelentwicklung zu vermuten. Erste morphologische Untersuchungen zeigten, dass auch die Phyllotaxis der Mutante *sc/31* erheblich gestört war. In dieser Mutante standen sich Kaulinblätter gegenüber, an Stelle einer spiraligen Anordnung. Die Kaulinblätter waren kleiner im Vergleich zu den Kaulinblättern des Wildtyp.

In einigen Fällen konnten auch Hochrosetten nachgewiesen werden. Teilweise entwickelte sich ein zweiter Seitentrieb aus den Achseln der Kaulinblätter. Der zweite Seitentrieb entwickelte kleine infertile Schoten. Eine Korrelation zwischen diesen Phänotypen und dem Expressionsmuster von *SCL31* konnte bisher jedoch nicht gefunden werden. GUS-Färbung konnte bereits in einem frühen Entwicklungsstadium in drei Tage alten Pflanzen im apikalen Meristem nachgewiesen werden (Abschnitt 3.1.1.3). Möglicherweise findet hier eine Fehlregulation im apikalen Meristem statt, die sich später in einer veränderten Phyllotaxis determiniert. Um zu bestätigen, dass es sich um signifikante Veränderungen der Mutante bzw. der Überexpression handelt, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Eine erhöhte Anzahl an Seitentrieben konnte bereits gezeigt werden (Abschnitt 3.4.3.2).

In adulten Pflanzen konnte das Expressionsmuster von *SCL31* nur in der Blüte und in seneszenten Blättern der Rosetten gezeigt werden (Abschnitt 3.1.1.3). Wie bereits unter Abschnitt 2.2.1 erwähnt, weist ein Phänotyp mit veränderter Phyllotaxis auf den Einfluss von Auxin hin. Auch die reduzierte Anzahl von Seitenwurzeln kann auf eine Regulation durch Auxin hindeuten. Eine Vielzahl von Auxinmutanten, unter anderem *axr1*, zeigen eine reduzierte Anzahl an Seitenwurzeln (Casimiro et al. 2003). Eine weitere Ähnlichkeit zwischen *axr1* und *sc/31* findet sich in der Gesamtlänge der Pflanzen. Beide Mutanten sind kürzer als der vergleichbare Wildtyp.

Auffällig war im Hinblick auf *SCL31* die Morphologie der Schoten (Abschnitt 3.4.3.6). Genetische und histologische Analysen durch Vivian-Smith aus dem Jahre 2000 ergaben, dass ein Auxinderivat als „Schoten-Differenzierungs-Signal“ auf die antiklinale Zellteilung und das Zellwachstum in den Schoten wirkt. Es konnte gezeigt werden, dass die *sc/31* Mutante mehr Schoten entwickelte. Dass die Mutante *axr1* weniger Schoten als der Wildtyp hat, lässt erkennen, dass Auxin in diesem Mechanismus eine Rolle spielt (Lincoln et al. 1990). Zudem ist die Distanz zwischen der ersten entwickelten Schote und der Rosette bei der *sc/31* Mutante größer und der Abstand zwischen den Schoten entlang des Stängels kürzer (Abschnitt 3.4.3.6). Möglicherweise handelt es sich bei dem Phänotyp bei *axr1* und *sc/31* bezüglich ihrer Gesamtlänge und ihrer Anzahl der Schoten um eine Gemeinsamkeit zweier Auxinmutanten. Vivian-Smith et al. stellten in ihrer Arbeit aus dem Jahre 2001 die Hypothese auf, dass verschiedene GRAS-Proteine in die Entwicklung der Schoten involviert sind. Sie verweisen jedoch insbesondere auf das Protein GAI, aus der DELLA-Untergruppe, das in die Wahrnehmung der Gibberellinsäure involviert ist (Dill et al. 2001) und die Proteine SCR und SHR, die eine Rolle in der asymmetrischen Zellteilung spielen (DiLaurenzio et al. 1996).

Die Mutationslinien *sc/31-1* und *sc/31-2* wiesen einen um sieben Tage früheren Blühzeitpunkt gegenüber dem Wildtyp auf. Entsprechend dieser Ergebnisse könnte auch SCL31 in den Blühsignaltransduktionsweg involviert sein. Ein Phänotyp der Überexpressionslinie *35S::SCL31* war die verminderte Abszission der Petalen (=Blütenblätter). Über den Mechanismus der Abszission ist die Pflanze in der Lage sich derer Organe zu entledigen, die aufgrund ihres Alters oder durch den Befall von Pathogenen nicht mehr in der Lage sind ihre Aufgabe zu erfüllen. Hierbei handelt es sich um einen komplexen Prozess, bei dem verschiedenste Genprodukte innerhalb unterschiedlicher Entwicklungsprozesse involviert sind. In der Regel wirft Columbia seine Blütenblätter bald nach der Entwicklung reifer Schoten ab. Lediglich an den obersten 5-8 Schoten finden sich in der Regel noch vertrocknete Petalen (Abschnitt 3.4.3.7). In der Überexpressionslinie *35S::SCL31* fanden sich die Petalen zum Teil bis zur 20. Schote (von terminal Richtung basal gezählt). Ebenso wies die GUS-Färbung der seneszenten Blätter und Blattstiele in sechs Wochen alten Pflanzen darauf hin, dass SCL31 in die Regulation der Abszission involviert sein könnte. Verminderte Abszission findet sich auch in Auxinmutanten wie z. B. *auxin responds factor2* (=arf2) (Okushima et al. 2003).

Eine Analyse der Microarraydaten lieferte den Hinweis auf eine erhöhte cDNS Expression von SCL31 in *arf7* und *arf9*, sowie der daraus generierten Doppelmutante *arf7/arf9*. Die Phänotypen der Auxinmutanten *arf7* und *arf9* zeigen reduzierte Auxinsensitivität und eine veränderte Hypokotyl- und Seitenwurzelentwicklung. Kreuzungen mit adäquaten Auxinmutanten könnten weiter über additive Effekte Aufschluss geben. Desweiteren könnten *sc/31* Mutanten und entsprechende Auxinmutanten wie *axr1* oder *arf2* wie auch die *max* Mutanten gepropft werden. Eine weitere Möglichkeit wäre es, *sc/31* mit DR5::GUS zu kreuzen, um eine mögliche Auxinakkumulation bzw. Auxinreduktion nachzuweisen. Die Ergebnisse bezüglich SCL31 wiesen deutlich auf einen Zusammenhang zwischen SCL31 und Auxin hin. Biochemische Zusammenhänge müssen hierzu noch analysiert und näher untersucht werden.

4.1.3 Mögliche additive Effekte von SCL8 und SCL31

Ähnlich der *sc/8* Mutanten findet sich in *sc/31* eine stark veränderte Phyllotaxis. Aufgrund ähnlicher Expressionsmuster und vergleichbarer Phänotypen zwischen den Mutanten bzw. Überexpressionslinien von SCL8 und SCL31 scheint es plausibel, dass diese Proteine überlappende Funktion haben könnten bzw. durch gleiche Hormone reguliert werden. Analog zu SCL8 (Abschnitt 3.4.1.7) scheint auch SCL31 in die Knospenruhe im Meristem einzugreifen und die Entwicklung von Wurzeln und Seitentrieben zu kontrollieren.

Weitere Hinweise wird die Analyse der bereits generierten Doppelmutante *sc/8/sc/31* ergeben. Sollten SCL8 und SCL31 ähnliche Aufgaben innerhalb unterschiedlicher Signalkaskaden in der Phyllotaxis wahrnehmen, könnten sich in dieser Doppelmutante ein additiver Effekt bezüglich dieses Phänotyps zeigen. Bei beiden Mutanten wäre es interessant zu sehen, inwieweit sich der Phänotyp der Mutanten und Überexpressionslinien unter Kurztagbedingungen entwickelt.

4.1.4 Bedeutung von Auxin und ABA für SCL8 und SCL31

Die phänotypischen Analysen von *sc/8* und *sc/31* wurden in Zusammenhang mit auxinregulierten und ABA-abhängigen Signaltransduktionswegen bereits diskutiert (Abschnitt 2.2.3). Von Auxin ist unter anderem bekannt, dass es das Streckenwachstum fördert, die apikale Dominanz aufrecht erhält und das Auswachsen von Seitenanlagen unterdrückt. Zudem fördert es die Entwicklung von lateralen Wurzeln. Für den Einfluss von Auxin auf SCL8 und SCL31 spricht auch, dass sowohl *SCL8* als auch *SCL31* in den Geweben und Organen exprimiert werden, in denen auch Auxin aktiv ist. Ein Beispiel für die Komplexität der Auxinsignalwege ist die Mutante *axr1*, die einen sehr pleiotropen Phänotyp besitzt (Abschnitt 2.4.5) und so auf eine Vielzahl verschiedener auxinabhängiger Entwicklungsprozesse hinweist. Inzwischen wurde von zwei Arbeitsgruppen gleichzeitig TIR1 als Auxinrezeptor identifiziert (Dharmasiri et al. 2005, Kepinski et al. 2005). Bisher konnten über 20 Transkriptionsfaktoren der ARF Proteinfamilie in *Arabidopsis* isoliert werden, die die Expression Auxin-abhängiger Gene regulieren und durch Proteine der Aux/IAA Familie kontrolliert werden (Ulmasov et al. 1997a, Guilfoyle et al. 2001, Tiwari et al. 2003, Okushima et al. 2005). Auxin gelangt in den Zellkern und übernimmt dort möglicherweise zusammen mit SCL8 regulatorische Aufgaben an der Transkriptionsmaschinerie.

Hypothesen bezüglich der Verzweigung besagen, dass Auxin das Auswachsen der Seitentriebe in Zusammenarbeit mit einem „second messengers“ reguliert (Tucker et al. 1978). Dabei wird unter anderem ABA bzw. ein Karotinoid-Derivat diskutiert (de Smet et al. 2003, Booker et al. 2005). Durch Chatfield et al. wurde im Jahre 2000 nachgewiesen, dass ABA dem Auswachsen der Seitentriebe entgegensteht und somit antagonistisch zu IAA wirkt. Tucker et al. postulierte 1978, dass ABA das Auswachsen der Knospen in direkter Weise unterdrückt. Im Jahre 2006 konnten Bennett et al. zeigen, dass ein Karotinoid-Derivat, abhängig von MAX, die Verzweigung von *Arabidopsis* reguliert. Es wird also interessant sein, diese Signalwege näher aufzuklären und zu sehen in welcher Weise die Hormone in diesen Signalweg involviert sind. Wird ABA direkt auf aktive Seitenknospen appliziert, wird deren weiteres Auswachsen unterdrückt (Taylor et. al. 1995).

In fast allen pflanzlichen Systemen führt die Entfernung des auxinreichen Spross-Apex zum Verlust der apikalen Dominanz, mit der gleichzeitig die Reduzierung der ABA-Menge in lateralen Knospen einhergeht (Tamas et al. 1995).

Appliziert man ABA gleichzeitig mit synthetischem Auxin wie NAA auf eine dekapitierte Spitze, wird das Auswachsen der Seitenknospen stärker unterdrückt als nur durch eines der beiden Hormone. In Studien zu ABA und Auxin konnte gezeigt werden, dass sich deren Signaltransduktionswege gegenseitig beeinflussen (Rock et al. 2005). Cline et al. publizierten im Jahre 2006, dass die Länge des auswachsenden Seitentriebes bei gleichzeitiger Gabe von entweder apikalem NAA und basalem ABA oder durch die Applikation einer Mixtur aus NAA und ABA auf die Sprossspitze extrem reduziert wird. Sollte das endogene ABA in *sc/8* erhöht sein, so wäre das eine Erklärung, warum die Anzahl auswachsender Seitentriebe sowie deren Länge bei dekapitierten Pflanzen, denen NAA appliziert wurde, nicht so deutlich reduziert waren im Vergleich zur Kontrollgruppe, wie zunächst erwartet (Abschnitt 3.4.1.14).

Inzwischen wurden mehrere Faktoren als ABA-Rezeptoren identifiziert. Hierzu gehört unter anderem das Protein FLOWERING LOCUS A (=FCA), das im Jahre 2006 von Razem et al. isoliert wurde. Ein weiterer ABA-Rezeptor „G-protein-coupled receptor“ (=GPCR2) wurde im Jahr 2007 von Liu et al. isoliert. Knospen der ABA-insensitiven Mutante *abi1* reagieren auf NAA wie der Wildtyp. Außerdem reagieren Knospen dieser Mutante nicht auf ABA oder auf ABA/NAA. Die Untersuchung der Zusammenhänge von ABI1 und SCL8 sowie deren Funktion innerhalb der Knospeninduktion könnte neue interessante Aspekte hervorbringen. In Arbeiten von Galoch et al. (1998) und Pearce et al. (1995) konnte eine positive Korrelation zwischen der Reduktion der ABA-Konzentration in Knospen einiger Spezies und dem Auswachsen der Seitentriebe nach ihrer Ruhephase nachgewiesen werden.

Ein weiteres Indiz, das auf eine mögliche ABA-Beteiligung im Zusammenhang mit SCL8 schließen lässt, war ein digitaler Northern-Blot, der mit Hilfe des Programms „Meta-Analysers“ auf den Seiten des „Genevestigators“ durchgeführt wurde. Hierbei wurden die Proteine SCL8, ABI1 und AXR1 unter bestimmten Konditionen bezüglich ihrer Expressionsrate untersucht. Während der verschiedenen Entwicklungsstadien einer Pflanze fand sich eine Korrelation der Expression zwischen *SCL8* und dem bereits erwähnten *AXR1*. Die Daten zeigten ebenso eine enge Korrelation zwischen *SCL8* und *ABI1* während der Knospenentwicklung. Die beiden Proteine SCL8 und ABI1 werden gemeinsam in der apikalen Region exprimiert.

Die Untersuchung der Ko-Expression *in silico* mit Hilfe des „efp-Browsers“ zwischen *ABI1* und *SCL8* zeigte eine enge Korrelation der beiden Gene (Abb. 85). Microarraydaten zeigten, dass die *SCL8* mRNA Konzentration in *abi1* Mutanten deutlich erhöht war, was auf einen Zusammenhang zwischen ABA und *SCL8* schließen läßt. Desweiteren war aus den Microarraydaten zu entnehmen, dass die *SCL8* Expression etwa 40 Minuten nach Zugabe von ABA ansteigt, jedoch nicht durch Inkubation mit GA_3 oder Wasser. Nach 180 Minuten war die Expressionsrate knapp dreimal so hoch wie bei den Referenzen (Abb. 85).

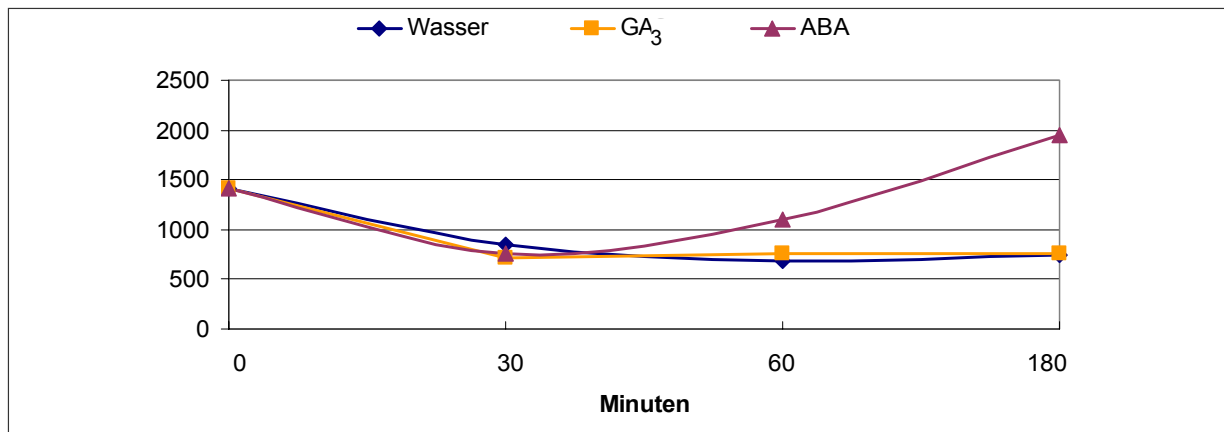


Abbildung 85: Expressionsrate („induction fold“) von *SCL8* aus Microarray Daten. Die cDNS-Konzentration von *SCL8* ist unter Einwirkung von ABA deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu ist *SCL8* unter Einwirkung von Wasser und GA_3 nicht erhöht.

Eine mögliche Theorie, die den Einfluß von *SCL8* beim Übergang von der vegetativen in die reproduktive Phase erklären könnte, ist der indirekte Einfluß auf das CO Protein über die vorhandene ABA-Menge. ABA kann über seine Konzentration die Expressionsrate von CO regulieren (Barth et al. 2006). Eine Möglichkeit, weitere Erkenntnisse über das ABA in den Mutanten der *sc/8* und *sc/31* zu erhalten, wäre eine Untersuchung mit einem System, bei dem ABA ein Reporter-gen aktivieren kann, ähnlich dem DR5-Element, das auf Auxin reagiert. Die Mutanten könnten nach dem Erscheinen des ersten Kaulinblattes dekapitiert werden und sowohl mit ABA-haltiger als auch NAA-haltiger Paste behandelt werden, um eine Veränderung in der Verzweigung nachvollziehen zu können. Die Mutante *sc/8* sowie die Überexpressionslinie 35S::*SCL8* könnte auf Trockenresistenz hin untersucht werden.

Wichtige Proteine der Blühinduktion sind spezifische Regulatoren wie CO, GI, FT, SOC1 und FLC (Koornneef et al. 1991). Sollte das Protein *SCL8* regulativ auf den Blühzeitpunkt einwirken, wäre es wichtig zu klären, in welcher Beziehung *SCL8* zu den Blühinduktionsgenen steht und welcher der Blühinduktionswege betroffen ist. Der verzögerte Blühzeitpunkt und die zeitlichen Veränderungen innerhalb der vegetativen Phase der *sc/8* Mutanten lassen vermuten, dass das Protein *SCL8* auch innerhalb des Blühinduktionswege regulative Aufgaben übernimmt.

Es ist vorstellbar, dass SCL8 dabei eine Art Schalter darstellt, durch den der Zeitpunkt der Transition bzw. des Erblühens geregelt wird. Möglicherweise ist die Identität der Meristeme unter anderem durch SCL8 determiniert. Das würde erklären, warum die *sc/8* Mutante von der vegetativen Phase zunächst in die reproduktive Phase übergeht und partiell wieder in die vegetative Phase zurückkehrt, bevor sie erneut in die reproduktive Phase eintreten kann.

Sowohl der Phänotyp der *sc/8* als auch der der *sc/31* Mutante zeigten sich äußerst pleiotrop (Abschnitt 3.4.1 und 3.4.3). Beide Proteine sind in die Phyllotaxis der Pflanze und weiteren entwicklungsrelevanten Prozessen beteiligt. Es sollte untersucht werden, ob in bekannten „Verzweigungsmutanten“ wie *max1*, *axr1* und *arabidopsis inositol polyphosphate 6-/3-kinase* (= *atlpk2*) die Expressionsrate von SCL8 und SCL31 im Vergleich zur Expressionsrate des WT verändert ist. Zusätzliche Kreuzungsexperimente zwischen *sc/8* und den Mutanten *max1*, *axr1* und *atlpk2* könnten klären, ob SCL8 an den gleichen Signalwegen beteiligt ist wie MAX, AXR1 oder ATIPK2.

4.1.5 Phänotyp der *sc/23* Mutante und der Überexpressionslinie 35S::*SCL23*

Die phänotypischen Untersuchungen dieser Mutante zeigten, dass diese Ergebnisse mit den Daten der Microarrays korrelierten. Aus *in silico* Studien der Microarray-Daten mittels „Genevestigators“ ging hervor, dass SCL23 vor allem unter Einfluss von ACC, Ethylen und Glucose reguliert wird. Die phänotypischen Untersuchungen führten zu der Vermutung, dass Glukose scheinbar einen schwachen Effekt auf die Wurzeln der Mutanten *sc/23-1* und *sc/23-2* hat (Abschnitt 3.4.2.3). Mit Glukose waren die Wurzeln der Mutanten *sc/23-1* und *sc/23-2* länger, ohne Glukose hingegen kürzer als beim Wildtyp (Abschnitt 3.4.2.3). Bei der Überexpressionslinie fanden sich sowohl mit als auch ohne Glukose längere Wurzeln. Das Protein SCL23 scheint also in Anwesenheit von Glukose das Wurzelwachstum in der Weise zu regulieren, dass es das Längenwachstum der Primärwurzel unterdrückt bzw. ohne Glukose das Streckenwachstum fördert. Die Glukose scheint eine reprimierende Wirkung auf bestimmte Entwicklungsprozesse der Wurzel zu haben. Dieses essenzielle Molekül kontrolliert die Entwicklung und die Genexpression der Pflanzen durch weitgehend unerforschte Mechanismen (Zhou et al. 1998). Ein Effekt in der Wurzelentwicklung war auf Grund der SCL23-Promotor-*GUS*-Färbungen nicht zu erwarten. Die Expressionsmuster zeigten Blaufärbung nur in den oberirdischen Teilen der Pflanze.

Ein anderer Phänotyp war die Entwicklung der Hypokotyle der Mutanten auf ACC, die in diesem Versuch länger waren als die des Wildtyps. Ohne ACC waren die Hypokotyle der Linien *sc/23-1* und *sc/23-2* deutlich kürzer als die des Wildtyps. Bei der Überexpressionslinie 35S::*SCL23* waren die Hypokotyle sowohl mit als auch ohne ACC länger als im Wildtyp. SCL23 wird also vermutlich durch ACC bzw. Ethylen beeinflusst.

Aus Microarray-Daten, die mit Hilfe des „Genevestigators“ durchgeführt wurden, ging hervor, dass unter 196 getesteten Mutanten die Ethylenmutante *ethylen insensitive 2* (= *ein2*), eine der höchsten Expressionsraten bezüglich *SCL23* aufwies. In Zusammenhang mit dem bereits beschriebenen Phänotyp der Hypokotyllänge auf ACC (Abschnitt 3.4.2.2), sind diese Daten ein Indiz dafür, dass *SCL23* in die Ethylensignaltransduktion involviert sein könnte.

Der Ethylen- und der Glucosesignalweg sind über den Hexokinase-Signaltransduktionsweg und die *glucose insensitive1* (= *gin1*) Mutante miteinander verknüpft (Zhou et al. 1998, Arenas-Huerta et al. 2006). Ein weiterer Zusammenhang zwischen Glucose und Ethylen ergab sich durch den Phänotyp der *sugar insensitive1* (= *sis1*) Mutante, die allelisch zu *constitutive triple response* (= *ctr1*) ist. Die Mutante *sis1/ctr1* wurde auf Grund ihres Succhrose-insensitiven Phänotyps gefunden. Sowohl *sis1/ctr1*, wie auch die Überexpressionslinie *35S::SCL23*, sind gegenüber den keimungshemmenden Effekten des Herbizids PAC, das die GA_3 Biosynthese hemmt, resistent (Rademacher et al. 1989, Gibson et al. 2001). Gibson et al. zeigten im Jahr 2001, dass exogenes ACC Pflanzen resistent gegen die negative Wirkung von PAC macht. So könnte die Resistenz der Überexpressionslinien *35S::SCL23* gegen PAC durch einen erhöhten ACC- bzw. Ethylengehalt erklärbar sein. Das Expressionsmuster von *SCL23* zeigte ausschließlich GUS-Färbung in den oberirdischen Teilen der Pflanze (Abschnitt 3.1.1.2). Eine Analyse der Expressionsmuster führte zu dem Ergebnis, dass die genannten Linien nicht durch Gibberellin stimuliert werden kann.

4.2 Proteinstruktur und evolutionärer Ursprung der GRAS-Proteine

GRAS Proteine bestehen aus einem konservierten C-Terminus und einem variablen N-Terminus. Der C-Terminus ist für die Stabilität des Proteins verantwortlich, die vermutlich über Phosphorylierung des Proteins reguliert wird. Beim variablen N-Terminus kann man davon ausgehen, dass er für die Signalwahrnehmung verantwortlich ist. Vermutlich ist der N-Terminus die Domäne, die für die spezifischen Aufgaben der jeweiligen Proteine verantwortlich ist. Die N-Termini der DELLA-Proteine haben innerhalb ihrer Untergruppe mit 55%-75% die größte Homologie innerhalb der GRAS-Proteine. Die Ergebnisse bezüglich der Lokalisation, die mit verschiedenen *SCL8-GFP*-Konstrukten durchgeführt wurden, liessen den Schluss zu, dass die Transaktivität, wie auch die Kern-Lokalisierung (Abschnitt 3.7.1) des *SCL8* Proteins im N-Terminus lokalisiert sein müssen, wie das bereits für die GRAS-Proteine LISCL aus *Lilly* und OsSLR1 aus *Oryza* nachgewiesen werden konnte (Itoh et al. 2002, Morohashi et al. 2003). Die Vermutung liegt nahe, dass Transaktivierung und Lokalisierungssequenz des *SCL31* ebenfalls im N-Terminus determiniert sind. Das Protein *SCL23* ist nicht transaktivierend, hat aber auch nur eine kurze N-terminale Domäne.

Die Leucin-reichen Domänen des C-Terminus könnten Proteininteraktionen ermöglichen. Gestützt wird diese Vermutung durch Arbeiten von Itoh et al. aus dem Jahre 2000, durch die gezeigt werden konnte, dass die Leucin-reichen Domänen in SLR1 für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich sind. Mit Hilfe von Ein- bzw. Zwei-Hybrid-Systemen konnten bezüglich der untersuchten Proteine SCL8, 23 und 31 weder Homo- noch Heterodimerisierung nachgewiesen werden. Die Proteine SCL8, 23 und 31 gehören unterschiedlichen Zweigen innerhalb der GRAS-Proteine an. *Sc/8* und *sc/31* zeigen ähnliche Phänotypen und *SCL8* und *SCL31* weisen ähnliche Expressionsmuster auf. Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass diese beiden Proteine eventuell miteinander interagieren könnten. Es konnte jedoch keine Heterodimerisierung nachgewiesen werden. Durch eine Überprüfung von *SCL8*, *SCL23* und *SCL31* in einem Hefe Zwei-Hybrid „Screen“ mit einer cDNS-Bank, könnten die Interaktionspartner dieser Proteine identifiziert werden. Eine Dimerisierung, wie bei den DELLA-Proteinen beschrieben wurde (Itoh et al. 2000), könnte so spezifisch sein, dass sie bei anderen Untergruppen der GRAS-Protein nicht gefunden werden kann. Möglicherweise ist der gemeinsame Ursprung der GRAS-Proteine im C-Terminus determiniert. Die N-Termini könnten auch durch Rekombination mit verschiedenen Genen erworben worden sein oder durch Genduplikation entstanden sein. Neue Proteindomänen könnten auch durch Fusion mit nicht-kodierenden DNS-Sequenzen entstehen (Copley et al. 2003).

4.3 Lokalisierung der GRAS-Proteine

Proteine, die für bestimmte Organellen innerhalb der Zelle vorgesehen sind, werden in aller Regel „adressiert“, um an ihren Bestimmungsort zu gelangen. Diese Signale zeichnen sich durch Gemeinsamkeiten in der Primärstruktur aus (Makkerh et al. 1996). Die subzelluläre Lokalisierung wurde durch die jeweilige Fusion von SCL8, SCL23 und SCL31 an GFP und der anschließenden transienten Expression der Proteine determiniert. Die drei Proteine akkumulierten deutlich im Zellkern (Abb. 73). Im Falle von SCL8 konnte durch Transformation verschieden langer *SCL8* Konstrukte, die mit GFP fusioniert waren, nachgewiesen werden, dass sich das Kernlokalisierungssignal des Proteins im variablen N-Terminus befinden (Abb. 74). Nur Konstrukte, die die ersten 191 Aminosäuren innerhalb des N-Terminus enthielten, fanden sich ausschließlich im Kern. Innerhalb dieser Sequenz von SCL8 befindet sich eine Reihe basischer Aminosäuren, welche als NLS wirken könnten (Abb. 75). Die Lokalisierung der Proteine im Zellkern ist ein Indiz dafür, dass es sich bei den SCL Proteinen um Transkriptionsfaktoren handeln könnte. Die Proteine AtRGA, OsGAI/SLR, AtRGL1, LiSCR, AtSCR und AtSHR akkumulieren im Kern. Die jeweiligen Sequenzen konnten bereits nachgewiesen werden (Silverstone et al. 1998, Nakajima et al 2001, Itoh et al. 2002, Morohashi et al. 2003).

Weitere Studien zeigten, dass Proteine wie AtPAT1 sowohl im Kern als auch im Cytoplasma akkumulieren (Bolle et al. 2000). In der Sequenz des SCL8 Proteins wurden Motive gefunden, bei denen es sich vermutlich um Kernlokalisierungssequenzen handeln könnte.

4.4 GRAS-Proteine als mögliche Transkriptionsfaktoren

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe eines Ein-Hybrid-Systems (Abschnitt 3.8.1) *in vitro* und *in vivo* durch einen GAL4-UAS-GUS Vektor (Abschnitt 3.8.2) nachgewiesen werden, dass SCL8 und SCL31 transaktivierende Eigenschaften besitzen. Diese Eigenschaft konnte dem Protein SCL23 nicht zugeschrieben werden. Der Grund hierfür liegt vermutlich im N-Terminus dieser Proteine. Im Vergleich zu SCL8 und SCL31 ist der N-Terminus von SCL23 stark verkürzt. Die Frage, ob es sich bei den GRAS-Proteinen um Transkriptionsfaktoren handelt wird zur Zeit kontrovers diskutiert. GRAS-Proteine zeigen mehrere strukturelle Merkmale von Transkriptionsfaktoren, wie homopolymere Sequenzen der Aminosäuren Prolin, Glutamin, Threonin, Serin, Glycin oder Aspartat, wodurch gegebenenfalls Wechselwirkungen mit der RNS-Polymerase induziert werden könnten. Die beiden Leucin-reichen Regionen der GRAS Proteine, die die VHID-Domäne flankieren weisen auf eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen den GRAS Proteinen und den STAT Proteinen hin (Richards et al. 2000). Bisher wurden GRAS-Proteine in Sequenzdatenbanken allein auf Grund ihrer strukturellen Merkmale als Transkriptionsaktivatoren aufgeführt. Es konnten noch keine DNS-bindenden Motive in GRAS-Proteinen identifiziert werden, die die These stützen, dass es sich bei GRAS-Proteinen um Transkriptionsfaktoren handeln könnte.

Möglicherweise fungieren GRAS-Proteine als transaktive Komponenten eines „Enhanceosoms“. Dafür sprechen die bereits erwähnten Leucin-reichen Regionen, die auf Protein-Protein-Interaktionen hinweisen, sowie nicht vorhandene DNS-Bindemotive. Innerhalb der Sequenz finden sich drei spiegelverkehrte LXXLL-Motive (Abb. 2), verteilt über etwa 100 Aminosäurereste (Heery et al. 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass Proteine mit LXXLL-Motiven, die Bindungsstelle für Ko-Aktivatoren blockieren und somit die Expression der Zielgene reprimieren können (Hall et al. 2000).

Das Wissen bezüglich dieser Proteinfamilie steht erst am Anfang und wird möglicherweise interessante Zusammenhänge innerhalb der Pflanzenentwicklung und wichtiger biologischer Funktionen aufzeigen.

5 Material

5.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.a. Qualität. Die eingesetzten Verbrauchsmaterialien wurden nach Herstellerangaben gelagert.

5.1.1 Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Ökotyp Col-0 und *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Ler (Lehle Seeds, Tucson, USA) wurden als Wildtypkontrolle für phänotypische Untersuchungen und für Rückkreuzungen eingesetzt. Bei den mutierten Linien handelte es sich um eine Transposon-Insertions-Linie (*sc18-1*) und sechs T-DNS-Insertions-Linien (*sc18-2*, *sc18-3*, *sc123-1*, *sc123-2*, *sc131-1* und *sc131-2*)(Tab.2).

Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Mutationslinien

Linie	Resistenz	bezogen von:
<i>sc18-1</i> (SGT5010)	Kanamycin	National University of Singapore
<i>sc18-2</i> (SALK 129947)	Kanamycin	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
<i>sc18-3</i> (SALK 102784)	Kanamycin	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
<i>sc123-1</i> (Sail 101_C01)	Basta	Syngenta Biotechnology
<i>sc123-2</i> (SALK 039920)	Kanamycin	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
<i>sc131-1</i> (Sail 812_F03)	Basta	Syngenta Biotechnology
<i>sc131-2</i> (GABI_848H11)	Sulfadiazin	MPI für Züchtungsforschung in Köln

5.1.2 Computerprogramme

Die vorliegenden Mutanten wurden mithilfe der Software DNA-Star analysiert. Diese Software enthielt Programme wie EditSeq, MapDraw und SeqMan (Fa. Lasergene).

5.1.3 cDNS-Bibliothek

Für die Amplifizierung der Gene *SCL* 8, 23 und 31 zu Klonierungszwecken wurde eine cDNS-Bibliothek von Invitrogen pSPORT-P „SuperScript Pre-made cDNS Library“ aus *Arabidopsis thaliana* verwendet.

5.1.4 Hormone

Abscissinsäure	Sigma
1-Aminocyclopropan-1-Carboxyl Säure	Roth
Gibberellinsäure	Roth
β-Indolyllessigsäure	Sigma
1-Naphtylenessigsäure	Sigma
trans-Zeatin ((E)-6-(4-Hydroxy-3-methylgut-2-enylamin) purin)	Sigma
2,4-D	Sigma

5.1.5 Pestizide und Hormonblocker

Basta	Sigma
Paclobutracol	Sigma

5.1.6 Enzyme und fertige Pufferlösungen

Sämtliche Restriktionsendonukleasen wurden von NEB und MBI Fermentas bezogen.

cDNS Omniscript Kit	Qiagen
DNS Gelladepuffer	Promega
DNase I	Roche
DNase-M Puffer	Roche
Gateway LR Clonase Enzym Mix	Invitrogen
Gateway BP Clonase Enzym Mix	Invitrogen
Lysozym	NEB
NBT/BCIP Reagenz	Promega
Prestained Protein Marker	NEB
Proteinase K	Promega
RNAse A	Promega
RNAse Inhibitor	Invitrogen
RT Puffer	Qiagen
Reverse Transkriptase (=RT) Superscript	Qiagen
Taq DNS Polymerase	Genexxon
Taq DNS Polymerase Puffer	Genexxon
TAKARA DNS Polymerase	Takara
TAKARA DNS Polymerase Puffer	Takara

5.1.7 Antikörper

Anti-SCL8	Pineda
Anti-GFP	Sigma
Anti-Kaninchen gekoppelt mit Meerrettich Peroxidase	Sigma

5.1.8 Antibiotika

Ampicillin 50 mg/ml	Merck
Chloramphenicol 25 mg/ml	Sigma
Gentamycin 10 mg/ml	Roth
Kanamycin 100 mg/ml	Merck
Spektinomycin 50 mg/ml	Roth
Streptomycin 50 mg/ml	Roth
Sulfadiazin 100 mg/ml	Roth

5.1.9 Kompetente Zellen

<i>E. coli</i> DH5α	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen
<i>E. coli</i> DB3 I	Invitrogen
<i>S. cerevisiae</i> , MaV203 Hefezellen	Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> UIA 143	Invitrogen

5.1.10 Vektoren

pENTR/D-TOPO® Vektor	Invitrogen
pENTR/SD-TOPO® Vektor	Invitrogen
pKGWFS7 Gateway Pflanzenvektoren	Karimi et al. 2002
pK7WGF2 Gateway Pflanzenvektoren	Karimi et al. 2002
pDest22-Vektor	Invitrogen
pDest32-Vektor	Invitrogen
pEXP-AD502	Invitrogen
pROK219-NAN	Kirby et al. 2002
pROK219-GUS	Kirby et al. 2002
p35SGBD-GW	Kirby et al. 2002
pEntr Directional TOPO Cloning Kit	Invitrogen

5.1.11 "Kits"

Histoiresin, Einbettungs-Harz	Leica
Pro Quest Zwei-Hybrid-System	Invitrogen
QIA PCR Purification Kit	Qiagen
QIA Gel Extraction Kit	Qiagen
QIA Minipräp Kit	Qiagen
QIA Midipräp Kit	Qiagen
RNAeasy RNS-Extraktions-Kit	Qiagen

5.1.12 Oligonukleotide

Die Auswahl der Oligonukleotiden erfolgte anhand der bekannten Sequenzen. Oligonukleotide wurden von verschiedenen Anbietern (Invitrogen und MWG-Biotech) bezogen. Die Oligonukleotide wurden in sterilem H₂O bidest. gelöst (Stammlösung 100 pmol/μl) und auf eine Endkonzentration von ca. 10 pmol/μl verdünnt.

8 ATG	5'-CACCATGGAATCTGGTTTCTCCGG-3'	24 Nt
8 -TGA	5'-ACGCCAAGCGGATGCGACAGTG-3'	22 Nt
8 TGA	5'-TTAACGCCAAGCGGATGCGAC-3'	22 Nt

8 146 f'	5'-GAGGAGTAAGCTAAGGAGTTTGATTGC-3'	27 Nt
8 373 f'	5'-CACCATGAGTTTGTGGTGGTTCTG-3'	26 Nt
8 481 f'	5'-CACCATGGGAATCGGGTCGGGTAT-3'	24 Nt
8 573 f'	5'-CACCATGTTGAATAGTTTAAGAG-3'	23 Nt
8 805 f'	5'-CCGTTTGCCTAGAACATACCGATG-3'	24 Nt
8 1092 f'	5'-CACCATGATGATACCGCACGTTATCG-3'	26 Nt
8 572 r'	5'-TCAGTTCTCCGATTCATGAACCC-3'	23 Nt
8 684 r'	5'-ACTTTGAATCCAATCGAATTTGAA-3'	24 Nt
8 1633 r'	5'-AGGAACCGTAGACTCGACCGACT-3'	23 Nt
8 DelCR	5'-TTAAAACGGCGCCGTATTCG-3'	20 Nt
8 DelN ATG	5'-CACCATGGAAATCGCGACGGCGATCG-3'	26 Nt
8 LZ-1 f'	5'-GCTCTAGATACGAGCTCTCTCCTTGTTTC-3'	29 Nt
8 LZ-2 f'	5'-GCTCTAGAGGGTGTGATCCCGACGAGAC-3'	28 Nt
8 LZ-1 r'	5'-GCTCTAGAAACCGTTTGCCTAGAACATACC-3'	30 Nt
8 LZ-2 r'	5'-GCTCTAGAACCTCTCTTCTCCACCGTCATC-3'	30 Nt
8 Prom f'	5'-CACCTGCTGACGCAATTTTC-3'	21 Nt
8 Prom 2 f'	5'-CACCGTTGCAATGGTGACAGTGTTTTATG-3'	28 Nt
8-1	5'-GAAGATTCCAGGAATCTGG-3'	19 Nt
8-2	5'-CCGACGTTGATAACAGTTCCTGG-3'	23 Nt
23 ATG	5'-CACCATGACTACAAAACGCATAG-3'	23 Nt
23 -TGA	5'-ATCGAACGGCTGAGATTTC-3'	22 Nt
23 Mitte f'	5'-GCAAGAATTGAGCTACGACGAT-3'	22 Nt
23 Prom f'	5'-CACCGGCAAGAAGATTATCTTATAC-3'	25 Nt
23-1 r'	5'-CCGAACGGAGAACATATCTC-3'	20 Nt
31 ATG	5'-CACCATGGAATCGAATTACTCAGG-3'	24 Nt
31 -TGA	5'-AGAAGGGACCCAACAAGAAGAAG-3'	23 Nt
31 Mitte r'	5'-GGATCTTTCAACGCACCGTTC-3'	21 Nt
31 Prom f'	5'-CACCGCAGAGTGTGACATCTCGTCATC-3'	27 Nt
31-1 r'	5'-CCGGAATCGAAGTTGGTAAG-3'	20 Nt
Aktin f'	5'-GCAACTGGGATGATATGGAAAAGA-3'	23 Nt
Aktin r'	5'-CAAACGAGGGCTGGAACAAGACT-3'	22 Nt
Basta f'	5'-CCAGAACGACGCCCCGGCCG-3'	19 Nt
Basta r'	5'-GTCATCAGATTTCCGGTGACGG-3'	21 Nt
DS 3-1	5'-GGTTCCCGTCCGATTTCTGACT-3'	21 Nt
DS 5-1	5'-ACGGTCGGGAACTAGCTCTAC-3'	22 Nt
Kanamycin f'	5'-CTCGTCAAGAAGGCGATAGAAG-3'	22 Nt
Kanamycin r'	5'-GGCAGGATCTCCTGTCATCTC-3'	21 Nt

GFP f'	5'-GGGATCACTCTCGGCATGGACG-3'	22 Nt
GFP r'	5'-CGGTGAACAGCTCCTCGCCC-3'	20 Nt
LB Gabi	5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'	23 Nt
LB Sail	5'-GAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3'	25 Nt
LB Salk	5'-GTTACGTCAGTGGGCCATCG-3'	20 Nt
LB Salk Koncz	5'-TTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGG-3'	25 Nt
M 13 f'	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	16 Nt
M 13 r'	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	17 Nt
RB Gabi	5'-GTGGATTGATGTGATATCTCC-3'	21 Nt
LB Sgt	5'-CGTTGCGGTTCTGTCAAGTTCC-3'	21 Nt
18S f'	5'-GCTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGG-3'	24 Nt
18S r'	5'-GGACGGTATCTGATCGTCTTCGAGC-3'	25 Nt

5.1.13 Verwendete Chemikalien

3-AT	Invitrogen
Acrylamid	Roth
Adenin-Hemisulfat	Sigma
Agar	Duchefa
Agarose	Duchefa
Aktivator	Leica
APS	Roth
β -Mercaptoethanol	Merck
Baktopepton	Merck
Baktotrypton	Merck
Bromphenolblau	Serva
BSA	Roth
Chloroform / Isoamylalkohol (24:1)	Roth
Coomassie Brilliantblau R250	Merck
CPRG	Invitrogen
CTAB	Roth
Cumarinsäure	Sigma
DMF	Roth
DMSO	Merck
dNTP Mix	Genaxxon
„Dropout“ Puder	Sigma
DTT	Sigma
EDTA	Sigma
Eisessig	Merck

Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Glucose	Roth
Glutaraldehyd	Serva
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Goldpartikel	Roth
HCl, 37 %	Roth
Hefeextrakt	Merck
HEPES	Roth
Histidin	Roth
IPTG	Roth
Isopropylalkohol	Merck
KaC	Roth
KCl	Merck
L-Aspartat (Hemi-Mg-Salz)	Sigma
Lithium	Roth
Lithium-Acetat	Roth
PEG ₄₀₀₀	Fermentas
Luminol	Sigma
Methanol	Merck
Methylenblau	Roth
Mg ₁₃₂ Proteasomen-Hemmer	Sigma Aldrich
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄	Merck
MOPS	Roth
MS-Salze	Duchefa
Na-Acetat	Sigma
NaCl	Merck
NaH ₂ PO ₄	Roth
Na ₂ HPO ₄	Roth
NaOH	Merck
N,N-Dimethylformamid	Sigma
N-Lauroylsarcosin	Sigma
Phenol/Chloroform, pH 6,7	Roth
Pepton	Sigma

Saccharose	Merck
SDS	Roth
Silwet L 77	Lehle Seeds
Spermidin	Roth
TEMED	Roth
TRIS	Roth
Triton X-100	Merck
Trizol	Invitrogen
Tween 20	Applichem
Uracil	Roth
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck
X-Gal	Roth
X-Gluc	Paclab
Xylencyanol	Sigma
YNB-AA/-AS	Sigma
1-kb-Leiter	Fermentas
ZnCl ₂	Merck

5.1.14 Filter, Membranen und sonstige Materialien

Plastikfilter „rupture disk“	Biorad
„Makro-Träger“	Biorad
Metallnetz	Biorad
PVDF Membran	Amersham Pharmacia
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia
Samtstempel	Invitrogen
Unguentum emulsificans aquosum	Caesar & Loretz
Whatman Papier	Schleicher & Schuell
Wolframkügelchen	Qiagen

6 Methoden

6.1 Pflanzenanzucht und Pflanzenhaltung

6.1.1 Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana Ökotypen Landsberg (=Ler) bzw. Columbia (=Col-0) wurde bei 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 70% kultiviert. Die tägliche Lichteinstrahlung betrug unter Langtag-Bedingungen 16 Stunden unter Kurztag-Bedingungen 8 Stunden. Die Kulturen wurden alle 2-4 Tage bewässert. Auf Medium vorgekeimte Pflanzen wurden nach zwei Wochen auf Erde umgesetzt und drei Tage unter transparenten Plastikkuppeln angezogen.

6.1.2 Kreuzungen

Nicht geöffneten Blüten des weiblichen Kreuzungspartners, die als Pollendonor dienten, wurden Kelch-, Blüten- und Staubblätter entfernt und die so freigelegte Narbe mit Pollen des männlichen Kreuzungspartners, dem Pollendonor, bestrichen. Dem Pollendonor wurden Blüten mit der Pinzette abgenommen, um die präparierten Blütenstempel des Pollenakzeptors damit zu bestäuben. Nach ca. zwei Wochen konnten die Samen geerntet werden. Die F1-Samen wurden auf Erde ausgesät. Die Samen der zweiten Generation (F2) wurden auf Selektionsmedium (1/2 MS + Kanamycin bzw. Basta) ausgelegt. Im Idealfall erfolgte daraus eine Segregation von 1:3. Durch die mit der T-Insertion eingebrachte Kanamycinresistenz konnten die Pflanzen selektiert werden. Pflanzen die das DR5-Element trugen, wurden durch das *GUS*-Reportergen selektiert. Selektierte Pflanzen wurden mit PCR mit den Oligonukleotiden „8 ATG“ und „8 1633 r“ überprüft. Es wurde nur mit Pflanzen weitergearbeitet, die in dieser Reaktion kein Amplifikat synthetisierten, kanamycinresistent waren und durch das *GUS*-Reportergen induzierte Blaufärbung zeigten. Durch die Kreuzung von Mutationslinien mit Wildtyppflanzen, die das auxinsensitive DR5-Element enthielten war es möglich, die Menge des vorhanden Auxin in Mutationslinien und den DR5-Linien zu untersuchen (Ulmasov et al. 1995). Beim DR5-Element handelt es sich um ein durch Auxin induzierbares Promotorelement, dass durch die Kopplung an ein *GUS*-Reportergen, die Detektion von Auxin ermöglicht. Aufgrund physiologischer Ähnlichkeiten zwischen den Mutanten *sc18* und *sc131* wurden auch die Linien miteinander gekreuzt.

6.1.3 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

- *LB-Medium, Luria-Bertani-Medium* (Sambrook et al. 1989)
0,1% (w/v) Bakto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,5% (w/v) NaCl
(Zugabe von 1,5% (w/v) Agar bei LB-Petrischalen)
- *Infiltration Lösung*
5% (w/v) Sucrose; 0,05% Silwet L-77

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach der sogenannten "Floral-Dip"-Methode (Clough et al. 1998). Zum Zeitpunkt der Infiltration waren die

Arabidopsis-Pflanzen etwa vier Wochen alt. Sieben Tage vor der Infiltration wurden die Stängel der Pflanzen noch einmal zurückgeschnitten, um die Anzahl der Blüten zu erhöhen. Am Tag der Infiltration waren die Pflanzen ca. 10 – 15 cm hoch und hatten durchschnittlich 15 – 20 Blütenstände. Das Infiltrationsmedium wurde in ein 500 ml Becherglas gegeben und die Pflanzen jeweils mit den Blüten voraus, bis unter die Rosette, für ca. 5 Sek. in das Infiltrationsmedium getaucht und dabei vorsichtig hin und her bewegt. Nach dem Infiltrieren wurden die Pflanzen mit einer Plastikkuppel abgedeckt, wodurch eine konstant hohe Luftfeuchtigkeit aufrecht erhalten wird. Zudem wurde durch die Plastikkuppel das Licht etwas absorbiert wodurch die Pflanzen vor allzu starker Sonneneinstrahlung geschützt werden sollten. Nach 24 Stunden wurden die Plastikkuppeln wieder abgenommen. Die Blütenstände der Pflanzen wurden jeweils zusammengebunden. Nachdem die Samen reif waren, wurden die einzelnen Pflanzen horizontal in Schalen gelagert, die mit Vliespapier ausgelegt waren. Etwa zwei Wochen nach der Infiltration konnten alle Samen geerntet und vom Vlies gesammelt werden.

6.1.4 Aussaat transformierter Samen

Die Samen der transformierten Pflanzen wurden auf ½-MS-Medium mit Kanamycin bzw. Basta selektiert. Als Kontrolle dienten die Wildtypen Columbia und Landsberg.

6.1.5 Oberflächensterilisation und Ausbringen der Samen

- *Chlorex Lösung*
50% Chlorex; 0,01% Tween
- *½ MS-Medium nach Murashige-Skoog*
0,5% (w/v) MS-Salze; 0,8% (w/v) Agar

Alle Samen, die auf Gewebekultur angezogen wurden, mussten zunächst sterilisiert werden. Die Samensterilisation erfolgte jeweils für 8 Min. in einer 50%-igen Chlorex Lösung. Im Anschluss wurden die Samen dreimal in sterilem Aqua dest. gewaschen. Die sterilisierten Samen konnten anschließend unter sterilen Bedingungen in 0,1% Agarose aufgenommen und durch eine 1.000 µl Kolbenhubpipette auf Petrischalen ausgebracht. Diese Petrischalen enthielten ½-MS-Medium. Abhängig vom jeweiligen Versuch, wurde gegebenenfalls zusätzlich ein entsprechendes Antibiotikum zur Selektion, Wachstumshemmer oder Hormone zugegeben. Die Petrischalen wurden mit Alufolie verdunkelt und bei 4°C stratifiziert. Nach einem Weißlichtpuls wurden die Petrischalen bei einer konstanten Temperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 70% in die Klimakammer gestellt und für 7 – 14 Tage dort belassen. Je nach Versuchsanordnung wurden jeweils Kontrollmedien angefertigt, die kein Hormon enthielten. Zu den Lichtversuchen wurden jeweils Kontrollen im Dunkeln durchgeführt. Sämtliche Versuche auf Gewebekultur wurden zur statistischen Absicherung dreimal wiederholt.

6.1.6 Selektion homozygoter Mutanten *sc18*, 23 und 31

Die Insertionslinien wurden mit der Polymerase-Kettenreaktion (=PCR) auf Homozygotie getestet. Für den ersten PCR-Ansatz wurde entsprechend der Lage der Insertion ein Oligonukleotid in der linken Grenzregion der Insertion und ein Oligonukleotid am Ende bzw. am Anfang des Gens gewählt, jeweils abhängig von der Orientierung der eingebrachten Insertion. Trägt mindestens ein Allel diese Insertion, so sollte in dieser PCR ein Amplifikat synthetisiert werden. In einem zweiten PCR-Ansatz wurden zwei Oligonukleotide gewählt, die jeweils links und rechts der Insertion positioniert waren. Sofern die zu untersuchende Linie homozygot war bezüglich ihrer Insertion, wurde in dieser PCR-Reaktion kein Amplifikat synthetisiert. Die so als homozygot identifizierten Mutanten wurden bis zur Samenreife herangezogen und in der nächsten Generation wiederum mit Basta, Kanamycin oder Sulfadiazin selektiert.

6.2 Physiologische Charakterisierung

Bei den folgenden physiologischen Analysen wurden 20 Pflanzen pro Linie ausgewertet. Für die Längenmessungen entwickelter Schoten, Sprosse, Hypokotyle und Wurzeln wurden die jeweiligen Pflanzenenorgane auf Agar-Petrischalen ausgelegt und fotografisch dokumentiert. Anschliessend wurden die Längen der jeweiligen Objekte mit dem Computer-Programm „Image J“ gemessen. Aus diesen Messungen wurde durch das Office-Programm „Excel“ der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet. Mit Hilfe des *t*-tests wurde die Signifikanz der Werte ermittelt. Die Signifikanz bezog sich dabei immer auf den korrespondierenden Wildtyp.

6.2.1 Ermittlung der Keimungseffizienz

Für die Ermittlung der Keimungseffizienz wurden die sterilisierten Samen auf ½-MS-Medium ausgelegt. Die Keimungseffizienz wurde unter Einfluss verschiedener Hormone untersucht. In diesen Versuchen wurde dem ½-MS-Medium jeweils ein Hormon zugegeben, 15 µM ABA, 2 µM GA3 oder 10 µM PAC (Antagonist der Gibberellinsäurebiosynthese). Bei der Analyse wurde bei jeder Linie die Anzahl der nach fünf Tagen gekeimten Samen ins Verhältnis zur Anzahl der insgesamt ausgebrachten Samen gesetzt.

6.2.2 Ermittlung der Anzahl wachstumsdefizienter Keimlinge

Die Samen der zu untersuchenden Linien wurden zunächst sterilisiert und auf ½ MS-Medium ausgelegt. Nach fünf Tagen konnten die Keimlinge unterschieden werden in solche, die wachstumsdefizient waren und solche Keimlinge die sich weiter entwickelten. Um zu überprüfen, dass es sich bei den wachstumsdefizienten Keimlingen nicht nur um eine Verzögerung in der Entwicklung handelte, wurden die Keimlinge weitere fünf Tage beobachtet.

6.2.3 Bestimmung der Wurzellänge

Für die Bestimmung der Wurzellänge wurden die Samen sterilisiert und auf $\frac{1}{2}$ -MS-Medium ausgelegt. Es folgte eine Stratifikation über vier Tage im Kühlschrank. Dadurch sollte eine gleichzeitige Keimung erreicht werden. Im Anschluß erhielten die Samen einen Weißlichtpuls für ca. 5 Stunden, wodurch die Keimung induziert wird. Je nach Fragestellung erfolgte das Umsetzen der Pflanzen auf frisches $\frac{1}{2}$ -MS-Medium mit 1% Glucose oder mit 10 μ M NAA. Durch das Phytohormons NAA, einem synthetischen Auxin, sollte gezeigt werden, ob und in welcher Weise die zu charakterisierenden Proteine in den Auxin-Transport-Weg involviert sind. Die Petrischalen wurden in vertikaler Position in die Klimakammer gestellt, bei einer täglichen Lichtexposition von 16 Stunden. Die Länge der Wurzel wurde auf der Unterseite der Petrischale mit einem Stift gekennzeichnet, um das Wurzelwachstum der folgenden sieben Tage dokumentieren zu können. Nach einer Woche wurden die Petrischalen auf Millimeterpapier gelegt und die Wurzeln so fotografiert, dass zwischen Wurzelende und der anfangs angebrachten Markierung gemessen werden konnte. Diese Strecke konnten am Computer mit dem Programm „Image J“ gemessen werden.

6.2.4 Bestimmung der Anzahl der Seitenwurzeln

Für die Bestimmung der Anzahl der Seitenwurzeln wurden die Samen zu Beginn sterilisiert und anschließend auf $\frac{1}{2}$ -MS-Medium ausgelegt. Die *sc/8* Mutanten und die *35S::SCL8* Überexpressionslinien wurden zusätzlich auch auf 10 μ M NAA auf die Anzahl der Seitenwurzeln analysiert. In beiden Versuchen, sowohl mit als auch ohne NAA, erfolgte eine Stratifikation über vier Tage im Kühlschrank, um eine gleichzeitige Keimung zu erreichen. Im Anschluß erhielten die Samen einen Weißlichtpuls für ca. 5 Stunden, wodurch die Keimung induziert wird. Die Petrischalen wurden nach dem Umsetzen in vertikaler Position in die Klimakammer gestellt, bei einer täglichen Lichtexposition von 16 Stunden. Nach 10 Tagen wurde der Mittelwert der Anzahl der Seitenwurzeln pro Linie analysiert.

6.2.5 Hypokotylllänge auf Ethylen

Die sterilen Samen wurden auf $\frac{1}{2}$ -MS-Medium ausplattiert die 10 μ M ACC, einem Vorläufer des Ethylens, enthielten. Die sterilisierten Samen erhielten einen 5-stündigen Lichtpuls und keimten anschließend im Dunklen. Nach vier Tagen wurden die Länge des Hypokotyls und Ausprägung des apikalen Hakens untersucht. Die Ermittlung der Hypokotylllänge erfolgte auf die gleiche Weise wie die Ermittlung der Wurzellänge.

6.2.6 Ermittlung des Blühzeitpunkts

Die Ermittlung des Blühzeitpunktes kann über zwei verschiedene Methoden erfolgen. Hierbei wurden zunächst die Samen auf Erde ausgesät und die Tage zwischen Aussaat und dem

Erscheinen der Knospen gezählt. Gleichzeitig wurde die Anzahl der Rosettenblätter dokumentiert. Pro Linie wurden 20 Pflanzen ausgewertet.

6.2.7 Physiologische Analyse adulter Pflanzen

Die physiologische Analyse der adulten Pflanzen erfolgte nachdem sich die gleichaltrigen Pflanzen sechs bis acht Wochen auf Erde unter Langtagbedingungen entwickelten. Es wurden mehrere physiologische Parameter untersucht. Hierfür wurden die Pflanzen aus der Erde genommen, auf einem Tuch ausgebreitet und quantifiziert. Zu den evaluierten Parametern gehörten unter anderem die Anzahl entwickelter Hochrosetten, die Anzahl der Kaulinblätter die sich gegenüberstanden und nicht spiraliger Anordnung folgten. Ebenso wurde die Anzahl zusätzlicher Seitentriebe ermittelt. Bei den Linien *sc/8* und *35S::SCL8* erfolgte dies auch unter Einfluss von NAA.

Die Gesamtlänge der Pflanzen wurde jeweils durch die Messung der Strecke zwischen Rosette und dem apikalen Ende der Pflanze mit einem Lineal gemessen. Bezüglich der Überexpressionslinie *35S::SCL8* wurde auch die Anzahl in Erscheinung getretener Knospen pro Tragblatt-Achsel gezählt. Der Verlust der apikalen Dominanz der Überexpressionslinie wurde durch die Messung der Strecke zwischen der Oberseite der Rosette und dem Ende des Seitensprosses bzw. des Hauptsprosses analysiert, indem beide Strecken zueinander ins Verhältnis gesetzt wurden. Bei den Linien *sc/31* und *35S::SCL31* wurden auch die Schoten betreffend vermessen. Hierzu gehörte die Ermittlung der Anzahl der Schoten, sowie die Messung der Strecke zwischen der Rosette und der ersten entwickelten Schote mit dem Lineal. Des Weiteren wurde der Abstand zwischen den einzelnen Schoten mit dem Lineal gemessen, sowie die Anzahl der Schoten je Pflanze gezählt, die eine verminderte Abszission ihrer Kelchblätter aufwiesen. Hierfür konnten die Pflanzen nicht aus der Erde genommen werden, da die Kelchblätter durch diesen Prozess eventuell abgefallen wären.

6.2.8 Herstellung NAA-haltiger Paste

- *NAA-haltige Paste*
10 µM NAA (eingerührt in Unguentum emulsificans aquosum)

Für diesen Versuch wurden Pflanzen bis zur Entwicklung des ersten Kaulinblattes in der Klimakammer bei Langtagbedingungen auf Erde herangezogen. Sobald sich das erste Kaulinblatt am Hauptspross bildete wurden die Pflanzen 1 cm über dem Tragblatt dekapitiert. Die Pflanzen wurden anschließend in zwei Gruppen aufgeteilt.

Der ersten Gruppe wurde über zwei Wochen täglich NAA-haltige Paste auf die dekapitierte Schnittstelle des Hauptspross appliziert. Der zweiten Gruppe wurde Paste ohne NAA aufgetragen. Am Ende des Versuchs wurde die Anzahl der entwickelten Seitensprosse aus

der Rosette gezählt, sowie die Länge des Seitensprosses aus dem ersten Kaulinblatt gemessen.

6.2.9 Kallusinduktion aus Wurzel- und Hypokotylfragmenten

- *Kallusinduzierendes Medium*

0,5% (w/v) MS Salze; 2% Glucose; 0,8% (w/v) Agar; pH 5,7; 6 μ M 2,4-D; 9 μ M Kinetin

Zunächst wurden Keimlinge für zehn Tage auf $\frac{1}{2}$ -MS-Medium angezogen. Das Hypokotyl und die Wurzel eines Keimlings wurden mit einem sterilen Skalpell jeweils in 5 mm lange Fragmente geschnitten. Für die Induktion eines Kallus wurden je ca. 5 mm lange Wurzel- oder Hypokotylexplantate für zehn Tage auf kallusinduzierendes Medium (Abou-Mandour et al. 1996) gegeben. Die Ergebnisse wurden fotografisch dokumentiert.

6.3 Molekularbiologische Methoden zur Analyse von DNS

6.3.1 Extraktion genomischer DNS (CTAB)

- *CTAB DNS-Extraktionspuffer*

100mM Tris/HCl; pH 8, 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM β -Mercaptoethanol

- *TE Puffer; pH 8,5*

1 M Tris; 0,5 M EDTA; 5,5% Eisessig

Für die DNS-Extraktion wurden etwa 100 mg Pflanzenmaterial in einer Kugelmühle (Fa. Retsch) homogenisiert. Das Pflanzenmaterial wurde mit 1 ml Extraktionspuffer und einer kleinen Wolframkugel in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Die Proben wurden kräftig geschüttelt. Durch die Wolframkugel wurde das Blattmaterial zerkleinert. Anschließend folgte eine Inkubation der Probe für 20 Min. bei 60°C. Zum Entfernen der Proteine wurden 0,8 ml eines Chloroform/Isoamylalokohol-Gemisches (24:1) zugegeben. Die Suspension wurde kräftig geschüttelt und für 3 Min. bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.000 UpM für 15 Min. und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Den Proben wurde das 0,7-fache Volumen Isopropanol zugegeben und zur Präzipitation gemischt. Es folgte eine Inkubation bei RT für 10 Min. mit anschließender Zentrifugation bei 13.000 UpM über 15 Min. bei 4°C. Das Nukleinsäuresediment wurde im Anschluß mit 1 ml eiskaltem 70%-igen EtOH versetzt und 5 Min. bei 13.000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 1 Stunde bei RT trocknen. Die Rücklösung der DNS erfolgte in 50 μ l TE Puffer (pH 8,5).

6.3.2 Extraktion genomischer DNS (SDS-Schnellmethode)

- *SDS DNS-Extraktionspuffer*

0,2 M Tris/HCl; pH 7,5; 0,25 M NaCl; 0,025 M EDTA; 0,5% SDS

- *TE Puffer; pH 8,5*

1 M Tris; 0,5 M EDTA; 5,5% Eisessig

Diese Methode bietet den Vorteil einer schnelleren DNS-Extraktion. Die so gewonnene DNS nur für PCR-Reaktionen geeignet. Etwa 100 mg Pflanzenmaterial wurden homogenisiert und bei RT aufgeschlossen. Es folgten 3 Min. Zentrifugation bei RT und 13.000 UpM. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 1 Vol. Isopropanol zugegeben, kräftig gemischt und 2 Min. bei RT inkubiert (=DNS-Fällung). Nach Zentrifugation bei 13.000 UpM für 5 Min. bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Die Resuspension erfolgte durch 40 µl TE Puffer für 1 Stunde im Kühlschrank.

6.3.3 Amplifikation der Scarecrow-like Gene *SCL 8, 23 und 31*

Für die Amplifikation von genomischer DNS bzw. cDNS wurden 5 ng genomische DNS, 5 µl 10 x Puffer, 0,5 µl Taq-DNS-Polymerase, je 2mM des Oligonucleotides „ATG“ bzw. „TGA“ (*SCL 8, 23, 31*), 0,2 mM dNTP Mischung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5 mM MgCl und H₂O auf 50 µl aufgefüllt und in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. Für die Amplifizierung von Genen wurde die ExTAQ von TAKARA verwendet. Bei der Polymerase handelte es sich um eine sogenannte „proof-reading“ Polymerase. Aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität erkennt sie falsch eingebaute Nukleotide und korrigiert diese Fehler. Die PCR wurde in einem Thermocycler (Fa. BioLabs) durchgeführt und startete mit einer dreiminütigen Denaturierung bei 95°C. Im Anschluss folgten 30 Zyklen mit 30 Sek. bei 95°C, 30 Sek. bei 58°C und 30-180 Sek. (=60 Sek./kB des Amplifikats) bei 72°C. Es folgte eine Inkubation über 5 Min. bei 72°C. Am Ende der PCR wurden 5 µl auf einem Agarosegel aufgetrennt.

6.3.4 Fällung der DNS für Klonierung und Sequenzierung

- *PEG-Lösung*
1 M Li-Ac; 10% 10 x TE Puffer; 50% PEG4000
- *TE Puffer, pH 8,5*
1 M Tris; 0,5 M EDTA; 5,5% Eisessig
- *3 M NaAc*
- *70% bzw. 95% EtOH*

Für einige Klonierungsschritte war es nötig, die Oligonukleotide nach der PCR-Reaktion zu entfernen. Die PCR-Reaktion wurde mit 4 Vol. TE Puffer verdünnt und anschließend ½ Vol. 50%-iges PEG₄₀₀₀ zugeführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 12.000 UpM für 15 Min.. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 40 µl TE Puffer resuspendiert. In Vorbereitung auf die DNS-Sequenzierung wurde die Fällung mit 3 M NaAc durchgeführt. Der DNS wurden 1/10 Vol. 3 M NaAc und 2 Vol. 95% EtOH zugegeben und für 1 h bei -20°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 4°C für 15 Min. bei 12.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden. Dem Pellet wurden 100 µl 70% EtOH zugefügt und

bei 4°C und 12.000 UpM für 15 Min. zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden, das getrocknete Pellet in 50 µl TE Puffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

6.3.5 Die Gateway® Technologie

Die Gateway® Klonierungs-Technologie (Fa. Invitrogen) ist ein relativ neues und universelles System zur Klonierung und Subklonierung von DNS-Sequenzen. Zunächst wird das in der Regel über PCR gewonnene DNS-Segment zwischen die seitenspezifischen Enden eines Vektors transferiert. Der Eingangs-Vektor (=Entry-Vector) pENTR/D-TOPO® von Invitrogen ist der Mittelpunkt dieses Systems. Über den Eingangsvektor ist es möglich das DNS-Fragment in verschiedene Destinationsvektoren zu rekombinieren, die dann zu unterschiedlichsten Zwecken wie z.B. Promotor-*GUS*-Expression, Überexpression oder Proteinfusion verwendet werden können. Durch den Mechanismus der sequenzspezifischen Rekombination entfallen wiederholte Exzisions- und Religationsschritte in die verschiedenen Vektoren, durch die sich Fehler wie Insertionen und Deletionen von Nukleotiden ereignen können. Der Eingangs-Vektor ermöglicht den Austausch des *CCDB*-Gens des Vektor gegen das DNS-Fragmen. Der Austausch erfolgte durch die Rekombination der *attR*- und *attL*-Sequenzen mit Hilfe des GATEWAY™ LR-CLONASE™ Enzym Mixes. Durch Rekombination der *attR*- und *attL*- Sequenzen war es möglich, eine Konstruktion mit einer LR-Clonase-Reaktion in den Destinationsvektor zu überführen. Der Enzymmix führt dazu, dass das PCR-Fragment über die beiden *att*-Sequenzen in das Wirtsgenom eingegliedert wurde (Lengele et al. 1999).

6.3.6 Klonierung in den pENTR/D-TOPO® Eingangsvektor

- *LB-Medium*
0,1% (w/v) *Bakto-Trypton*; 0,5% (w/v) *Hefeextrakt*; 0,5% (w/v) *NaCl*
(Zugabe von 1,5% (w/v) *Agar* bei *LB-Petrischalen*)
- 1,2 M *NaCl*; 60 mM *MgCl₂*

Der pENTR/D-TOPO®-Vektor (Abb. 86) ist kovalent an das Enzym Topoisomerase I aus dem Vaccina-Virus gebunden. Dieses Enzym ist in der Lage jedes doppelsträngige DNS-Fragment, mit einer CACC-Sequenz am 5'-Terminus, in den Vektor zu ligieren. Deshalb mussten alle DNS-Sequenzen, die in den Eingangsvektor ligiert wurden, mit einem vorwärtsgerichteten Oligonukleotid amplifiziert werden, das eine CACC-Sequenz am 5'-Ende enthielt. Die Oligonukleotide waren so gewählt, dass das Stoppkodon des Gens eliminiert wurde, um später C-terminale Fusionen zu ermöglichen.

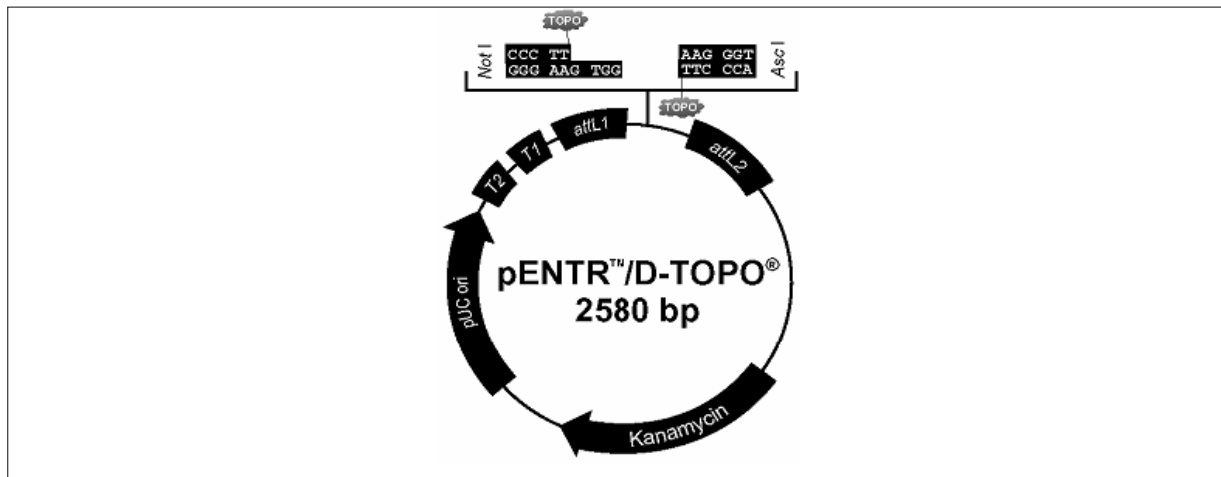


Abbildung 86: Karte des Eingangsvektors pENTR/D-TOPO®. Mit Hilfe der Topoisomerase I (=TOPO) wurden die Amplifikate über eine 5'-CACC-Sequenz in den Vektor ligiert. Die eingebrachte DNS wurde auf beiden Seiten von einer attL-Rekombinationsstelle flankiert, wodurch die Konstruktion in Destinationsvektoren mit attR-Stellen rekombiniert werden konnte. [Entnommen aus <http://www.invitrogen.com>]

Beiderseits der eingebrachten DNS befinden sich attL-Sequenzen, welche die spätere Rekombination in den Destinationsvektor ermöglichen. Die Klonierungsstelle des pENTR/D-TOPO-Vektors wird flankiert von einer Not I und einer Asc I Schnittstelle. Der Vektor besitzt zudem einen prokaryontischen Replikationsursprung (=„ori“), der für die Amplifikation in *E.coli* nötig ist (Abb. 86). Der Vektor codiert für eine Kanamycinresistenz, das für die Selektion des Vektors in *E. coli* nötig war. Für die Klonierung des PCR-Fragments in den pENTR-Vektor wurden 5-10 ng des aufgereinigten PCR-Produkts, 1 µl Salzlösung und 1 µl pENTR / D-TOPO® Vektor eingesetzt. Die Ansätze wurden 30 Min. bei 25°C inkubiert und anschließend in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf kanamycinhaltigen LB-Medium ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 8 Kolonien in 3 ml kanamycinhaltiges Flüssig-LB-Medium überführt und über Nacht bei 180 UpM und 37°C geschüttelt. Tags darauf wurden die Vektoren aus den Bakterien mittels Minipräparation isoliert und in 50 µl TE Puffer aufgenommen. Die Konstruktionen wurden im Anschluss durch PCR und Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

6.3.7 Klonierung in den Gateway-Destinationsvektor

- TE Puffer; pH 8,5
1 M Tris; 0,5 M EDTA; 5,5% Eisessig

Für die Transformation des DNS-Fragments vom Entry-Vektor in den jeweiligen Destinations-Vektor wurden 300 ng des Eingangs-Klons, 100 ng Destinations-Vektor, 4 µl 5 x LR Clonase™-Reaktionspuffer auf 16 µl mit 1 x TE Puffer aufgefüllt und zuletzt 3 µl LR-Clonase™-Enzym Mischung zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei 25°C inkubiert und im Anschluss für 10 Min. bei 37°C mit 2 µl Proteinase K (2 µg/µl) verdaut. Durch dieses Enzym wurde die Clonase abgebaut. Die DNS wurde daraufhin transformiert. Die Proteinase K selbst wird im Anschluss durch Erhitzen für 10 Min. bei 65°C inaktiviert.

Alle Vektorkonstruktionen wurden mit Restriktionsanalyse und spezifischer PCR kontrolliert. Die Konstruktionen wurden am Ende sequenziert, um sicher zu gehen, dass es sich um das richtige Fragment handelte und die Sequenz fehlerfrei war. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Destinationsvektoren verwendet. Für das Zwei-Hybrid-System wurden die Vektoren pDEST22 und pDEST32 (Vidal et al. 1996) eingesetzt. Die Protein-GFP-Fusionsexperimente wurden mit Hilfe des Vektors pK7WGF2 durchgeführt. Für Promotoranalysen wurde der Vektor pKGWFS7 verwendet (Karimi et al. 2002).

6.3.8 Herstellung kompetenter Zellen aus *E. coli*

- *Tfb1 Puffer*
30 mM K-Ac; 50 mM MnCl₂; 100mM KCl; 10 mM CaCl₂; 15% Glycerin
- *Tfb2 Puffer*
10 mM Na-MOPS; pH 7,0; 75 mM CaCl₂; 10mM KCl; 15% Glycerin
- *LB-Medium*
0,1% (w/v) Bakto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,5% (w/v) NaCl; 1 M MgSO₄
(Zugabe von 1,5% (w/v) Agar bei LB-Petrischalen)

Die DH5 α Bakterien wurden auf LB-Medium mit 1 M MgSO₄ ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Kolonie in 5 ml LB MgSO₄ überführt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Der gesamte Inhalt des Kolbens wurde in 100 ml LB-Medium überimpft und ca. 2 Stunden bis zu einer OD von 0,5 angezogen. Die Arbeiten erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden im Anschluss für 10 Min. bei 6.000 UpM im JA 21-Rotor bei 4°C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 2 x 40 ml Tfb1 Puffer resuspendiert und anschließend 5 Min. auf Eis inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen für 10 Min. bei 6.000 UpM zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 8 ml Tfb2 Puffer aufgenommen und in 200 μ l Aliquoten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Herstellung kompetenter *A. tumefaciens* Zellen wurde gleichermaßen durchgeführt. Lediglich die Inkubations-Temperatur ist bei *A. tumefaciens* niedriger, sie beträgt nur 28°C.

6.3.9 Transformation in den pENTR-Vektor und den Destinations-Vektor

- *LB-Medium*
0,1% (w/v) Bakto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,5% (w/v) NaCl
(Zugabe von 1,5% (w/v) Agar bei LB-Petrischalen)
- *SOC-Medium*
2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄;
20 mM Glukose

Für die Transformation in den pENTR-Vektor wurden jeweils 2 μ l der Ligation entnommen und in 50 μ l kompetente TOP-10-Zellen überführt. Die Ligation in den jeweiligen Destinations-Vektor erfolgte mit 1 μ l des überprüften Plasmids in 50 μ l DH5 α Zellsuspension. Die weiteren Schritte der Transformation unterschieden sich nicht. Zunächst wurde der

jeweilige Ansatz 30 Min. auf Eis inkubiert. Dem folgte ein Hitzeschock für 30 Sek. bei 42°C. Im Anschluss wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Dem Transformationsansatz wurden 250 µl SOC-Medium zugesetzt und er wurde für rund 60 Min. bei 37°C geschüttelt. Nach 1 Stunde wurden 150 µl des Transformationsansatzes auf LB-Kanamycin-Petrischalen ausgestrichen, die entsprechend dem eingesetzten Vektor, ein Antibiotikum zur Selektion der Klone enthielten. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurden acht Kolonien in Kulturröhrchen mit 3 ml LB-Flüssigmedium vereinzelt, die ebenfalls das dem Vektor entsprechende Antibiotikum enthielten und über Nacht bei 37 °C und 180 UpM inkubiert.

6.3.10 Transformation in *Agrobacterium tumefaciens*

- *LB-Medium*

0,1% (w/v) Bakto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,5% (w/v) NaCl
(Zugabe von 1,5% (w/v) Agar bei LB-Petrischalen)

Hierzu wurden kompetente *A. tumefaciens* Zellen des Stammes UIA 143 verwendet. Für die Transformation wurden 2 µl Gateway-Plasmids in 500 µl *A. tumefaciens* Suspension eingebracht und 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 37°C über 1,5 Min. wurden der Reaktion 800 µl LB-Medium hinzugefügt und für 45 Min. bei 28°C geschüttelt. Die transformierten Agrobakterien wuchsen auf festem Medium unter dem Selektionsdruck drei verschiedener Antibiotika. Die Selektion erfolgte auf Petrischalen mit LB-Medium das 0,2% Spektinomycin, 0,2% Streptomycin und 0,1% Gentamycin enthielt. Nach zwei Tagen wurde jeweils 6-8 Klone ausgewählt und in flüssiges LB-Medium übertragen. Die Bakterien wurden bei 28°C über Nacht geschüttelt und im Anschluss die Plasmid-DNS durch eine Midi-Präparation isoliert und mittels PCR und Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

6.3.11 Plasmidpräparation im Mini-Maßstab

- *TE Puffer; pH 8,5*

1 M Tris; 0,5 M EDTA; 5,5% Eisessig

Für die Minipräparation wurden 2 ml der bakteriellen Zellsuspension einer Übernachtskultur in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 14.000 UpM für 5 Min. bei 4°C pelletiert. Die weiteren Schritte der Plasmidpräparation wurden mit dem QIAprep® Minipräp „Kit“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Die bei der Plasmidpräparation gewonnenen DNS-Mengen belaufen sich auf etwa 5 - 20 µg, die in 50 µl 1 x TE Puffer aufgenommen wurden.

6.3.12 Plasmidpräparation im Midi-Maßstab

- *TE Puffer; pH 8,5*

1 M Tris; 0,5 M EDTA; 5,5% Eisessig

Für diese Präparation war eine größere Menge einer *E. coli* Kultur nötig. Hierzu wurde eine Starterkultur in 3 ml LB/Streptomycin/Spectinomycin-Flüssigmedium inokuliert. Eine Starter-Kultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag in 50 ml frisches LB/Streptomycin/Spectinomycin-Flüssigmedium überführt. Die Kultur wurde dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mithilfe des QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (Fa. Qiagen) die Plasmidpräparation nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die bei der Plasmidpräparation gewonnenen DNS-Mengen beliefen sich auf etwa 50 - 100 µg, welche in 50 µl 1 x TE Puffer aufgenommen wurden.

6.3.13 Überprüfung der Klone durch PCR

Als Kontrolle, ob ein Vektor das richtige DNS-Fragment aufgenommen hatte, wurden routinemäßig Bakterienkolonien mit Hilfe von PCR getestet. Dazu wurden Klone von LB-Petrischalen genommen und in 20 µl dest. H₂O aufgeschwemmt. Für diese Kontroll-PCR wurde jeweils 1 µl der Vektorkonstruktion als Matrize eingesetzt. Die genspezifischen Oligonukleotide wurden mit einer Verdünnung von 10 pmol/µl zugesetzt. Es wurde eine PCR-Reaktion mit 3 Min. Denaturierung bei 95°C, 30 Zyklen 1 Min. 95°C, 1 Min. 58°C Anlagerungstemperatur und 1 Min. Verlängerung der Primer bei 72°C (Synthese des neuen DNS-Strangs) durchgeführt.

6.3.14 Überprüfung der Klone durch Restriktion von Plasmiden

- "Superdo" Puffer

330 mM Tris / HCl; pH 7,8; 625 mM KCl; 100 mM MgCl₂; 40 mM Spermidin; 5 mM DTE

Die Plasmide wurden mit Hilfe entsprechender Restriktionsenzyme analysiert. Das Enzym Bsp1407 I ist in der Lage jegliche att-Seiten des Gatewaysystems zu schneiden. Hierzu wurden 0,5 µl des Enzyms, 1 µl des sogenannten "Superdo" Puffers, 3 µl Transformationsansatz und 6,5 µl H₂O für mindestens 1 h inkubiert.

6.3.15 Überprüfung der Klone durch Sequenzierung

Vektoren, die die richtigen Fragmente eingebaut hatten, wurden zur Sequenzierung vorbereitet. Hierzu wurden je 1000 Bp Sequenzlänge rund 200 ng der DNS eingesetzt und 10 pmol/µl des vorwärtsgerichteten bzw. rückwärtsgerichteten genspezifischen Oligonukleotids in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Es wurden nur Plasmide weiter verwendet, die keinen Fehler in ihrer Sequenz hatten.

6.4. Molekularbiologische Methoden zur Analyse von RNS

6.4.1 Extraktion von RNS

Für die RNS-Extraktion wurde 50 mg Blattmaterial einer Pflanze verwendet. Das Material wurde zusammen mit einem Wolframkügelchen in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und unter Einwirkung eines Extraktionspuffers in einer Kugelmühle (Fa. Retsch)

aufgeschlossen. Die RNS des homogenisierten Pflanzenmaterials wurde im weiteren Verlauf mittels RNeasy Mini Kit® von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert.

6.4.2 DNase I Verdau

Reste genomischer DNS wurden mit DNase I entfernt, die der extrahierten RNS zugesetzt wurde. Dazu wurden 1 µg RNS, 1 µl DNase I, 1 µl DNase-M Puffer, 0,2 µl RNase-Inhibitor auf 10 µl H₂O aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation für exakt 10 Min. bei 37°C. Die DNase I wurde im Anschluss durch die Zugabe von 1 µl 25mM EDTA bei 65°C deaktiviert.

6.4.3 Photometrische Bestimmung der Konzentration von RNS und DNS

Das Photometer wurde eingesetzt, um die Konzentration und Reinheit von RNS, DNS und Oligonukleotiden zu überprüfen. Die Messung erfolgte in einer Mikroküvette mit dem Photometer Amersham Ultraspec mit 1:100 Verdünnung der jeweils zu untersuchenden RNS, DNS bzw. Oligonukleotide.

Mit Hilfe der Formel $\frac{\Delta 260 \cdot F \cdot 100 (\text{Verdünnung})}{1000} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurde die Konzentration errechnet.

(F=Faktor: 50 bei DNS, 40 bei RNS und 20 bei Oligonukleotiden)

6.4.4 Reverse Transkriptase-PCR

Die RNS wurde mit einer Reverse-Transkriptions-Reaktion (=RT-PCR) in cDNS umgeschrieben und anschließend in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Hierfür wurden von der mit DNase I verdauten RNS 2 µg entnommen und mit 2 µl Oligo-dT Oligonukleotid und 5 µl RNS-freiem H₂O bei 65°C für 10 Min. denaturiert. Dem Reaktionsansatz wurden 0,2 µl RNase Inhibitor, 0,2 µl Reverse Transkriptase, 1 µl dNTP und 1 µl 10 x RT Puffer zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde für 10 Min. bei 25°C (Anlagerung der Oligonukleotide) inkubiert. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 1 Stunde. Anschließend wurde das Enzym bei 85°C für 2 Min. inaktiviert. Die cDNS wurde in einer PCR Reaktion mithilfe genspezifischer Oligonukleotide quantifiziert. Hierfür wurde eine PCR 3 Min. denaturiert bei 95°C, 30 Zyklen 1 Min. 95°C, 1 Min. 58°C Anlagerungstemperatur und 1 Min. Verlängerung der Primer bei 72°C (für die Synthese des neuen DNS-Strangs) durchgeführt. Durch die DNS der T-Insertionslinien und der Transposon-Linie sollten keine Fragmente synthetisieren, sofern es sich um homozygote Mutanten handelte. Die Überexpressionslinien und der Wildtyp sollten mit Hilfe der genspezifischen Oligonukleotide in einer PCR-Reaktion ein Fragment synthetisieren. PCR-Reaktionen, die DNS der Überexpressionslinien als Matrize enthielten, sollten eine höhere Konzentration des jeweiligen Amplifikats aufweisen vergleichen mit dem Wildtyp.

6.4.5 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese

- 1 x TE Puffer
1M Tris/HCl; pH 8; 0,5 M EDTA; 5,5% Eisessig
- "Superdo" Puffer
330 mM Tris / HCl; pH 7,8; 625 mM KCl; 100 mM MgCl; 40 mM Spermidin; 5 mM DTE
- DNS-Ladepuffer
3 Vol. Formamid; 1 Vol. Formaldehyd; 0,6 Vol. MOPS Puffer; 0,4% Bromphenolblau
- Gelladepuffer
50% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol
- 10 x MOPS Puffer
200 mM 3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure; 80 mM NaAc; 10 mM EDTA

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte in Flachbettkammern in 1%-igen Agarosegelen. Aufgetragenen RNS-Proben wurden in „MOPS“-Gel mit 1 x MOPS Puffer in 1 µl Ethidiumbromid durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in 1 x TE Puffer. Die Proben wurden vor dem Beladen der Gele mit 1/6 Vol. Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Bei einer Spannung von 80 Volt trennte sich die DNS bzw. RNS entsprechend ihrer Größe auf.

6.5 Biochemische Methoden zur Analyse von Proteinen

6.5.1 Isolierung von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*

- Proteasomen-Hemmer
2% Mg₁₃₂ (20 mg/ml) (gelöst in DMSO)
- Homogenisationspuffer
50 mM Trisacetat; pH 7,9; 100 mM K⁺-Acetat; 1 mM EDTA; 1mM DTT; 20% Glycerol
- 2 x SDS Beladungspuffer
10 mM Tris; pH 6,8; 200 mM DTT; 4% SDS; 0,1% Bromphenolblau;
20% Glycerin; 1 M DTT (gelöst in 0,01 M NaAc pH 5,0)

Im Vorfeld der Proteinisolierung wurde das pflanzliche Material 1 h in dem Proteasom-Hemmer Mg₁₃₂ 20 mg/ml bei RT inkubiert. Durch diesen Proteasom-Hemmer sollte der natürliche Proteinabbau reduziert werden, um die Detektion des Proteins zu erleichtern. Zur Extraktion der zellulären Proteine wurden 150 mg Blattmaterial in 1 ml eiskaltem Homogenisationspuffer im Mörser zerkleinert und mit 1 Vol. 2 x SDS Beladungspuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben 10 Min. bei 90°C denaturiert und 10 Min. bei 10.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und sofort auf ein SDS-Proteingel aufgetragen oder bei -20°C eingefroren wurde.

6.5.2 SDS-Gelelektrophorese

- Sammelgel
0,125 M Tris-HCl; pH 6,8; 4% Acrylamid; 1% SDS; 0,008 Vol. 10% APS; 0,002 Vol TEMED

- *Trenngel*
0,375 M Tris-HCl; pH 8,8; 12% Acrylamid; 1% SDS; 0,005 Vol. 10% APS; 0,001 Vol. TEMED
- *SDS-PAGE Laufpuffer*
48 mM Tris; 40 mM Glycin; 0,04% SDS; 20% MetOH
- *Coomassie-Färbelösung*
0,2% Coomassie Brilliant Blau R250; 10% Essigsäure; 50% MetOH; 1% Glycerol
- *Coomassie Entfärber*
5% MetOH; 7,5% Essigsäure

Proteinpräparationen wurden in einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Pro Geltasche wurden 20 µg Protein und 15 µl des Proteinstandards aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 140 V.

6.5.3 Bestimmung des Proteingehalts eines Extrakts

Der Proteingehalt wurde über eine Verdünnungsreihe bestimmt, von der Aliquote auf ein Whatman-Papier pipettiert und dann bei 65°C getrocknet wurden. Danach wurde das Papier für 30 Sek. in Coomassie-Färbelösung gelegt und für 5 Min. unter fließendem Wasser gewaschen. Die Intensität der Anfärbung der verschiedenen Proben wurde mit einem Standard von Invitrogen verglichen und so die Menge abgeschätzt, die man benötigt, um vergleichbare Mengen Protein bei einer SDS-PAGE aufzutragen.

6.5.4 Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membran

- *PBS Puffer*
- *1 x PBS; 0,5% Tween 20*
- *Blockierungslösung*
- *5% BSA in PBS; 0,5% Tween 20*
- *Western-Transfer Puffer*
- *40mM Glycin; 48mM Tris; 0,037% SDS; 20% MetOH*
- *Luminol Lösung*
- *100 mM Tris-HCl; pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 0,4 mM Cumarinsäure*
- *Wasserstoffperoxid Lösung*
- *100 mM Tris-HCl; pH 8,5; 0,02% H₂O₂*
- *Detektionspuffer*
- *0,1 M Tris/HCl; 0,1 M NaCl; pH 9,5; 1 % NBT/BCIP in 10 ml Detektionspuffer*

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese immunologisch nachgewiesen. Die Proteine die sich nach dem Auftrennen im Trenngel befanden, wurden über Nacht auf eine PVDF-Membran bei 40 mA geblottet. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran dreimal 10 Min. in 1 x PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 30 Min. in Blockierungslösung inkubiert und für 15 Min. in 1 x PBS gewaschen. Die Membran wurde dann in etwa 10 ml einer 1:500 Verdünnung des primären Antikörpers

(in 1 x PBS) bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die nicht gebundenen primären Antikörper durch mehrfaches waschen in 1 x PBS entfernt. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membran mit in PBS verdünntem Sekundärantikörper (1:10.000).

Im Anschluß wurde die Membran dreimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper abzuwaschen. Der primäre IgG-Antikörper, war gegen ein SCL8-Peptid gerichtet (anti-SCL8) und aus Kaninchen gewonnen worden. Der Fc-Teil des Antikörpers wurde durch den sekundären Antikörper „anti-IgG Kaninchen“ gebunden. Dieser war an die Peroxidase aus Meerrettich konjugiert. Die Detektion mit Hilfe des SCL8-Antikörpers erfolgte durch kurze Inkubation in einem 1:1 Gemisch aus Luminol und einer Wasserstoffperoxidlösung. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol, das sich in einem angeregten Zustand befindet. Das Luminol fällt in seinen Grundzustand zurück, wobei Licht emittiert wird. Dieses Licht kann durch Auflegen eines Röntgenfilms nachgewiesen werden. Die Membran wurde zunächst mit dem Gemisch benetzt und die überschüssige Lösung nach ca. 1 Min. wieder abgenommen. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Signalstärke und lag zwischen 2 Min. und 1 Stunde. Anschließend wurde der Film entwickelt und fixiert.

Der primäre Antikörper der gegen GFP (anti-GFP, C-terminal) gerichtet war, wurde aus dem Blut von Mäusen gewonnen. Der sekundäre Antikörper, der gegen Maus-IgG gerichtet war, war kovalent an eine alkalische Phosphatase gebunden. Für den Nachweis wurde die Membran in 2 ml Detektionspuffer und 40 µl NBT/BCIP-Reagenz inkubiert. Das Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid (=NBT) liegt in der oxidierten Form vor, während 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (=BCIP) reduziert ist. BCIP ist das Substrat für die alkalische Phosphatase, die eine Phosphat-Gruppe abspaltet. Bei dieser Reaktion entsteht BCired, das der Reduktion-Oxidations-Partner des NBT ist. Im Folgenden wird das farblose, lösliche BCi oxidiert und das farblose, lösliche NBT reduziert. Durch diese Reaktion entstehen zwei blaue unlösliche Stoffe, die als „Blue Dye“-Präzipitat optisch detektierbar sind. Die Membran wurde in der Detektionslösung im Dunkeln inkubiert, bis das Präzipitat deutlich sichtbar wurde. Am Ende wurde die Reaktion durch Wasser beendet.

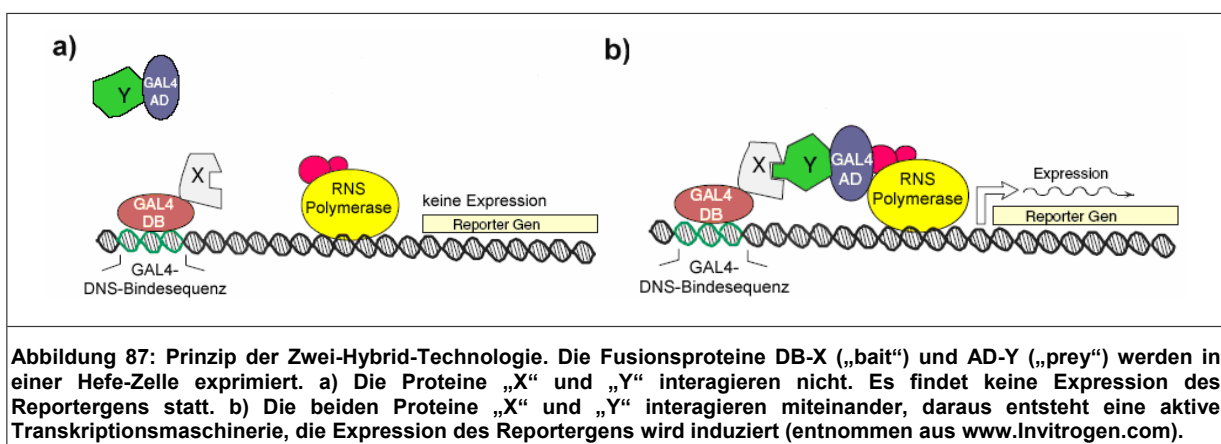
6.6 Das ProQuest™ Hefe-Zwei-Hybrid-System

Bei der von Chien et al. 1991 entwickelten Zwei-Hybrid-Technik handelt es sich um ein *in vivo* System zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen in intakten Zellen. Dieses System stützt sich auf zwei Fusionskomponenten, deren Grundlage der Transkriptionsfaktor β -Galaktosidase (=GAL4), aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist. Diese Transkriptionsmaschinerie wird in seine beiden strukturellen Elemente, die DNS-Bindedomäne (=DB) und die Aktivierungsdomäne (=AD), getrennt und an jeweils einen

der beiden Interaktionskandidaten „X“ und „Y“ fusioniert (Abb. 87). Durch die räumliche Nähe der Interaktionskandidaten „X“ und „Y“ wird die Expression eines Reporter-Gens wie zum Beispiel *GUS* oder ein Gen der Histidin-Biosynthese induziert (Abb. 87). Bei diesem System wurde die cDNS eines Gens für das Protein, dessen Interaktionspartner gesucht wird, als „Köder“ in den Bindungsdomänenvektor eingesetzt, während eine cDNS-Bank in die Aktivierungsdomänenvektor kloniert wurde.

Durch einen prokaryontischen Replikationsursprung (=ori) war es möglich diesen Vektoren in *E. coli* Bakterien des Stammes DH5 α zu transformieren. Die Vektoren pDEST22 (AD-Domäne) und pDEST32 (DB-Domäne) kodieren außerdem für die Resistenzgene Gentamycin, bzw. Ampicillin, wodurch die Klone in den Bakterien selektiert werden können. Zudem befindet sich im Vektor pDEST22 das Gen *TRP1*, das es den Hefe-Zellen ermöglicht auf Medium zu wachsen, das kein Tryptophan enthält. Der Vektor pDEST32 trägt das Gen *LEU2*. Das Protein LEU2 ermöglicht das Wachstum auf Leucin-freiem Medium. Durch Aktivierung des Reportergens für die Histidin-Biosynthese wuchsen nur die Hefen auf Histidin-freien Selektionsmedium, in denen eine Protein-Protein-Interaktion stattfinden konnte. Die Elemente AD und DB bilden dann eine aktive Transkriptionsmaschinerie, die sich an die GAL4-DNS-Bindesequenz heftet, die vor den Reportergenen liegt.

Die Gene *SCL8*, *SCL23* und *SCL31* wurden aus dem Entry-Vektor in die Destinationsvektoren pDEST22 und pDEST32 kloniert. Damit die beiden Fusionsproteine im Zellkern akkumulieren, muss an die DNS-Aktivierungsdomäne zusätzlich eine NLS fusioniert werden, falls das Protein „Y“, selbst kein NLS besitzt sollte. Das NLS von GAL4 ist in der DNS-Bindedomäne kodiert. Sowohl die Sequenz der DNS-Bindedomäne als auch die der Aktivierungsdomäne von GAL4 wurden N-terminal an die Konstruktionen fusioniert und in die Vektoren rekombiniert. Je ein rekombinanter pDEST22-Vektor und pDEST32-Vektor wurden gemeinsam in den kompetenten Hefestamm MaV203 transformiert. Durch das Zwei-Hybrid-System „ProQuest“ (Fa. Invitrogen) war es möglich homologe oder heterologe Dimerbildungen zwischen *SCL8*, *SCL23* und *SCL31* nachzuweisen.



6.6.1 Induktion der Kompetenz von *Saccharomyces cerevisiae*

- *YPAD-Medium*
1% Hefeextrakt; 2% Bacto-Pepton; 2% Glukose; 0,003% Adenin-Hemisulfat
- *Li-Lösung*
1 M Lithiumacetat; 10 x TE Puffer pH 7,5

Die Induktion der Kompetenz des Hefestamm *S. cerevisiae* MaV203 (Fa. Invitrogen) wurden in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Hierfür wurden 300 ml „Yeast-Pepton-Adenin-Hemisulfat“ (=YPAD-Medium) mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht bei 30°C und 180 UpM geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 300 ml YPAD-Medium mit der Übernachtskultur auf eine Extinktion $E_{600} = 0,1$ bis 0,2 angeimpft. Anschließend wurde die Kultur solange bei 30°C und 180 UpM inkubiert, bis sich die Kultur in der späten log-Phase befand. Die Zellen wurden bei 4.000 UpM und RT für 5 Min. sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in 10 ml sterilem Wasser aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension bei 6.000 UpM und RT für 5 Min. sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die kompetenten Zellen in 1,5 ml Li-Lösung resuspendiert.

6.6.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

- *PEG-Lösung*
1 M Li-Ac; 10% 10 x TE Puffer; 50% PEG4000
- *SC-leu-trp-Medium*
1,5% (w/v) YNB -AA/-AS; 0,3% (w/v) „Dropout“ Puder; 2% Agar
- *40%-ige Glukose-Lösung*
- *20 mM Uracil*
- *20 mM Histidin*
- *Z Puffer*
60 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,0; 40 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM KCl; 1 mM MgSO_4 ; pH 7,0
- *X-Gal-Stocklösung*
2% (w/v) X-Gal in N,N-Dimethylformamid
- *X-Gal-Lösung*
1,7% X-Gal-Stocklösung; 0,6% β -Mercaptoethanol (gelöst in Z Puffer)

Für die Transformation von *S. cerevisiae* wurden die PEG Lösung und das SC-leu-trp-Medium autoklaviert. Zu diesem Medium wurden 50 ml einer sterilfiltrierten 40%-igen Glukose-Lösung, 8 ml 20 mM Uracil und 8 ml 20 mM Histidin steril filtriert und hinzugefügt. Im Anschluss wurden 1 μl der Plasmid-DNS und 100 μl der kompetenter Hefe (in Li-Lösung) in 1,2 ml PEG Lösung überführt. Die Transformationsansätze wurden 30 Min. bei 30°C geschüttelt. Im Anschluss wurde ein Hitzeschock bei 42°C über 20 Min. durchgeführt. Dann wurden die Zellen für 5-10 Sek. sedimentiert und in 200 μl 1 x TE Puffer resuspendiert. Aus diesem Transformationsansatz wurden 200 μl auf das SC-leu-trp-Medium ausplattiert und für 2 - 5 Tage bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurde eine „Master“-Petrischale für den

3-AT- und den X-Gal-Test (Abschnitt 3.8.1) angeimpft. Für diese Petrischale mit festem Medium wurden je 4 Kolonien aller zu testenden Transformanten auf einer SC-leu-trp-Petrischale ausgestrichen, und für 18 - 24 Stunden bei 30°C inkubiert.

6.6.3 Plasmidpräparation aus *Saccharomyces cerevisiae*

- 3% SDS/0,2 M NaOH
- 1 x TE Puffer
1M Tris/HCl; pH 8; 0,5 M EDTA; 5,5% Eisessig
- 3 M NaAc
- Phenol/Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)
- 70% EtOH

Die Plasmide, die in *S. cerevisiae* transformiert worden waren, wurden mittels Plasmidpräparation isoliert. Die verschiedenen Hefekulturen wurden über Nacht in 1 ml flüssigem SC-leu-trp-Medium bei 30°C angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen sedimentiert und in einem alkalischen Aufschluss in 100 µl 3%-igem SDS/0,2 M NaOH resuspendiert. Die Aufschlüsse wurden gemischt und 15 Min. bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 500 µl 1 x TE Puffer, pH 7,5, und 60 µl 3 M Na-Acetat zugegeben. Durch Zugabe von 600 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurden die Proteine und andere Zellbestandteile gefällt. Es folgten 2 Min. kräftiges Mischen. Im Anschluss wurden die Ansätze 2 Min. lang bei 14.000 UpM zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde im folgenden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Phenol:Chloroform-Schritt wiederholt.

Die DNS wurde durch die Zugabe von 650 µl eiskaltem Isopropanol und zwanzigminütiger Inkubation bei -20°C gefällt. Die gefällte DNS wurde durch fünfminütige Zentrifugation bei 14.000 UpM sedimentiert und der Überstand verworfen. Das DNS-Sediment wurde mit 100 µl 70% EtOH gewaschen und anschließend in 10 µl 1 x TE Puffer resuspendiert. Der verwendete Hefestamm MaV203 ist ein „low-copy“-Stamm, was bedeutet, dass nur eine Kopie des Plasmids pro Zelle zur Verfügung steht. Diese geringe Menge wäre nicht ausreichend, um sie auf einem Agarosegel sichtbar zu machen, daher wurden die Konstruktionen mit Hilfe einer PCR nachgewiesen. Hefen sind metabolisch besonders aktive Organismen was zur Folge hat, dass große Menge an mRNS vorliegen, die eine PCR-Reaktion stören würde. Aus diesem Grund wurde vor der PCR ein RNase-Verdau durchgeführt. Je nach DNS-Menge wurden zwischen 1 und 5 µl Plasmid-Präparation in die PCR eingesetzt. In den folgenden Tests wurden die Kolonien von dieser „Master“-Petrischale auf die testspezifischen Petrischalen durch einen Samtstempel übertragen.

6.6.4 Der 3-AT-Test

- SC-leu-trp-Medium
1,5% (w/v) YNB -AA/-AS; 0,3% (w/v) „Dropout“ Puder; 2% Agar

- **3-AT(= 3-Amino-1,2,4-Triazol)-Medium**
25 mM 3-AT-Pulver; 1,5% (w/v) YNB -AA/-AS; 0,3% (w/v) "Dropout" Puder; 2% Agar
- **3-AT-Flüssigmedium**
25 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol; 1,5% (w/v) YNB -AA/-AS; 0,3% (w/v) "Dropout" Puder

Der Nachweis des 3-AT-Tests wurde mit Hilfe des Reportergen *HIS3* durchgeführt. Dieses Gen kodiert für die Imidazol-Glycerin-Phosphat-Dehydratase (=IGPD, E.C. 4.2.1.19). Die Dehydrase ist essentiell für die Biosynthese des Histidins. Durch 3-AT wird das IGPD spezifisch inhibiert. Der Hefestamm MaV203 exprimiert zwar selbst eine marginale Menge an *HIS3*, doch bereits eine geringe 3-AT-Konzentration inhibiert die IGPD. Nach dem Autoklavieren des 3-AT-haltigen Mediums wurden 50 ml einer 40%-igen Glucose und 8 ml 20 mM Uracil steril filtriert und dem Medium beigemengt. 3-AT-Festmedien wurden mit verschiedenen Endkonzentration von 0 mM, 25 mM, 50 mM und 100 mM angefertigt.

Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden bei 30°C wurde das Koloniemuster der „Master“-Petrischalen mit einem Samtstempel auf die Petrischalen der unterschiedlichen 3-AT-Konzentrationen transferiert. Hierbei ist ein starker Hintergrund zu vermeiden, aus diesem Grund wird ein „replica cleaning“ durchgeführt. Dieses „replica cleaning“ bedeutet, dass den frisch gestempelten 3-AT-Petrischalen durch einen sauberen Samtstempel noch überschüssiges Material abgenommen wird. Die Ausgangsmengen der transferierten Kolonien sollten augenscheinlich etwa gleich sein, um das Wachstum der Kolonien pro Zeiteinheit beurteilen zu können. Die Petrischalen wurden dann im Anschluss für 24 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Intensität des Wachstums der Kolonien dokumentiert.

6.6.5 Der X-Gal-Test

Die Ergebnisse des 3-AT Tests wurden durch einen weiteren Versuch, den sogenannten X-Gal-Test, bestätigt. In diesem Versuch wurde die Aktivität der β -Galaktosidase (einer Hydrolase, EC 3.2.1.23) qualitativ bestimmt. Dieses Reportergen wurde erstmals von Teeri et al. 1989 beschrieben. Die β -Galactosidase steht unter Kontrolle des GAL4-Promotors. In diesem Test wird sich eine spezielle Eigenschaft des Enzyms β -Galaktosidase zu Nutze gemacht. Es kann neben Laktose, seinem eigentlichen Substrat, auch andere Laktose-Analogons wie z. B. das X-Gal, zu hydrolysieren. Die β -Galactosidase setzt den Indikator X-Gal zu einem blauen Produkt um. Durch Oxidation entsteht das so genannte 5-Brom-4-Chlor-3-Indol. Es kommt zu spontaner Dimerisierung, wodurch ein blaues Präzipitat gebildet wird. Durch die Blaufärbung konnte das Produkt optisch nachgewiesen werden. Eine Nylonmembran wurde auf die Größe der Petrischale zugeschnitten. Mit einem Samtstempel wurde das Kolonienmuster der „Master“-Petrischale auf die Nylonmembran übertragen.

Die YPAD-Petrischale wurde mit der darin befindlichen Nylonmembran über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Tatsache, dass die Nährstoffe des YPAD-Mediums durch die Membran diffundierten ermöglichte es den Zellen auf der Nylonmembran zu wachsen. Eine Petrischale mit einem Durchmesser von 15 cm wurde mit zwei Lagen saugfähigem Filterpapier ausgelegt. Dabei war darauf zu achten, dass das Filterpapier blasenfrei in 10 ml X-Gal-Lösung getränkt wurde. Die Nylonmembran, auf der die Kolonien gewachsen waren, wurde von der YPAD-Petrischale abgezogen und 30 Sek. lang in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Hefezellen wurden dadurch aufgebrochen und die β -Galaktosidase freigesetzt. Die Membran wurde auf die getränkten Filterpapiere gelegt und bei 37°C inkubiert. Die nach 24 Stunden entwickelte Farbentwicklung wurde dokumentiert.

6.6.6 Der CPRG-Test

- *SC-leu-trp-Flüssigmedium*
1,5% (w/v) YNB -AA/-AS; 0,3% (w/v) „Dropout“ Puder; 2% (w/v) Agar
- *YPAD-Medium*
1% (w/v) Hefeextrakt (fest); 2% (w/v) Pepton; 2% (w/v) Glucose; 0,003% (w/v) Adenin-Hemisulfat; 1,5% (w/v) Agar
- *CPRG Puffer1*
178 mM HEPES; 67,5 mM NaCl; 4,5 mM L-Aspartat (Hemi-Mg-Salz); 75 mM BSA;
3,75 mM Tween 20; 2,25 mM MgCl₂; pH 7,3
- *CPRG Puffer2*
27,1 mg CPRG; 20 ml CPRG Puffer1

Mit diesem Versuch wurde die β -Galaktosidaseaktivität quantitativ, durch Berechnung der Galaktosidase-Einheiten ermittelt. Das CPRG wird durch die β -Galaktosidase gespalten. Durch diese Spaltung entstehen Galaktose und das wasserlösliche rote Chlorphenol, das spektrometrisch erfasst werden kann (Simon et al. 1987). Für diesen Versuch wurden 2,5 ml SC-leu-trp-Flüssigmedium jeweils durch eine Kolonie inokuliert und über Nacht bei 30°C bei 180 UpM geschüttelt. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Über-Nacht-Kultur in 5 ml YPAD-Medium gegeben und unter Schütteln bei 30°C bis zu einer Extinktion von E₆₀₀ = 1,0 - 1,5 inkubiert. Die Kulturen wurden im Anschluss 1:2 mit YPAD-Medium verdünnt. Grund dafür war die Tatsache, dass photometrische Messungen ab einer Extinktion größer als 0,8 ungenau werden. Die ermittelten Werte wurden mit dem Faktor 2 multipliziert. Danach wurden je 1,5 ml der Kultur in drei Reaktionsgefäße gefüllt. Diese Zellen wurden im Anschluss für 30 Sek. bei 14.000 UpM sedimentiert, in 1 ml CPRG Puffer1 gewaschen und in 100 μ l CPRG Puffer1 resuspendiert.

Für den Aufschluss wurde den Zellen 1 Vol. sterilisierte Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,5 mm zugegeben und die Ansätze 2 Min. kräftig geschüttelt. Danach wurden 900 μ l CPRG Puffer2 zu den Ansätzen gegeben und die Zeit gemessen. Als Referenz wurden

100 µl Puffer1 und 900 µl Puffer2 gemischt und inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln. Sobald die Färbung der Ansätze von gelber in rot/braune Farbe schlug, wurden die Reaktionen durch 250 µl 6 mM ZnCl₂ gestoppt. Zellbruchstücke und Glasperlen wurden durch Zentrifugation für 1 Min. bei 14.000 UpM sedimentiert. Die Absorption eines 1 ml Überstandes bei 574 nm wurde gegen die beschriebene Referenz bestimmt. Dabei wurde 1 Einheit als die β-Galaktosidase-Menge definiert, die pro Minute 1 µM CPRG in Chloramphenicol-Rot und D-Galaktosidase spaltet. Der Bereich dieser Messung lag zwischen 0,25 und 1,8. Die relative quantitative β-Galaktosidaseaktivität wurde durch Berechnung der Galaktosidase Einheiten ermittelt. Die Berechnung der Einheiten erfolgte durch die Formel:

$$\beta\text{-Galaktosidase Einheiten} = 1000 \times E574 / (t \times V \times E600)$$

t = Zeit der Inkubation [min], V = Volumen der Kultur im Test [ml] (hier 1,5 ml), E574 = Extinktion bei 574 nm durch Chloramphenicol-Rot, E600 = Zelldichte am Anfang der Messung

6.6.7 Das Ein-Hybrid-System

Für die Untersuchung der Transaktivität wurde das Zwei-Hybrid-System in ein Ein-Hybrid-System modifiziert. Die Konstruktion wurde in den Vektor pDEST32 rekombiniert und anschließend mit dem Vektor pEXP-AD502, in den Hefestamm MaV203 transformiert. Eine Ko-Transformation war in diesem Fall nötig, da Vektoren wie pDEST22 das Gen *TRP1* enthält und die Zellen ohne diesen Vektor nicht auf tryptophanfreiem Medium wachsen könnten. Durch Expression der Reportergene *HIS3* und *β-Gal* wurden die Fusionsproteine DB:SCL8, DB:SCL23 und DB:SCL31 im 3-AT-, im X-Gal- und im CPRG-Test auf ihre transaktivierende Fähigkeit getestet. Positivkontrolle war ein Hefe-Stamm, der mit den Plasmiden pPC97-Fos und pPC86-Jun transformiert wurde. Als Negativkontrolle diente ein Hefe-Stamm, der mit den beiden Kontrollplasmiden pDB-LEU und pEXP-AD502 transformiert war. Der Vektor pDB-LEU trägt das Gen *LEU2* und ermöglicht es den Zellen auf den gegebenen Medien zu wachsen.

6.7 Histologische Methoden

6.7.1 GFP- und GFP-GUS-Fusionen mit SCL8, 23 und 31

In der vorliegenden Arbeit wurden das *GFP* (Chalfie et al. 1994) für die Überexpression und *GFP-GUS* für die Promotoranalyse als Reportergene eingesetzt. Aufgereinigten Amplifikate der Gene *SCL8*, *23* und *31* wurden über den Eingangsvektor pENTR/D-TOPO mit LR-Clonase-Reaktion in den Destinationsvektoren pK7WGF2,0 rekombiniert. Die Plasmide wurden für die Komplementation und die Überexpression von *SCL8*, *23* und *31* konstruiert. Für die Analyse der Promotoraktivität wurde die Promotor-Region mit PCR aus genomischer DNS amplifiziert und über den Eingangsvektor mit Hilfe der LR-Clonase in den Vektor

pKGWFS7,0 ligiert. Die Promotor-Fragmente waren so gewählt, dass möglichst alle regulatorischen Abschnitte, die vor dem Gen liegen, in diesem Amplifikat enthalten waren.

Beide Vektoren besitzen eine Streptomycin- als auch eine Spektinomycin-Resistenz. Die Reportergene der Vektoren befanden sich jeweils C-terminal des ligierten DNS-Fragments. Diese Reihenfolge hatte den Vorteil, dass bei einer Leserastermutation im inserierten Element kein falsch positives GFP- bzw. GUS-Signal detektierbar war. Für die Herstellung der Fusionsproteine wurden Oligonukleotide gewählt, die für kein Stoppkodon kodieren (Abschnitt 5.1.12). Die Konstruktionen wurden durch PCR und Restriktionsenzyme überprüft. Durch Sequenzierung mit flankierenden Oligonukleotiden wurden die Sequenzen überprüft und in Datenbanken abgeglichen. Es wurde nur mit Klonen weitergearbeitet, bei denen kein Fehler in der Sequenz festzustellen war.

6.7.2 Präzipitation des Plasmidvektors an Goldpartikel

- *Goldpartikel*
1,6 μM Goldpartikel in 50%-igem Glycerin

Konstruktionen der GFP- und GFP-GUS-Fusionen mit SCL8, 23 und 31 wurden zusammen mit den Vektoren mit Hilfe des ballistischen Transfers (Abschnitt 3.7) in Zwiebelepidermiszellen bzw. Lauch eingebracht. Für die Beladung der Goldpartikel wurden zwischen 2,5 – 5 ng der Plasmid-DNS aus Mini- bzw. Midi-Präparation mit 15 μl Goldpartikel gemischt. Vor Entnahme der Goldpartikelsuspension musste diese kräftig gemischt werden, da das Gold sehr schnell wieder sedimentiert. Es folgte die Zugabe von 15 μl 2,5 M CaCl_2 und 6 μl 0,1 M Spermidin. Die DNS wurde mit 200 μl 70%-igem EtOH an die Goldpartikel präzipitiert, mit 200 μl 100% EtOH gewaschen und 1 Min. bei 1500 UpM bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 25 μl 100% EtOH aufgenommen.

6.7.3 Ballistischer Transfer beladener Goldpartikel in Pflanzenmaterial

Aus der präparierten Goldpartikelsuspension wurden 5 μl auf einen „Makro-Träger“ aufgetragen. Es wurde jeweils eine Konstruktion durch eine „Partikelkanone“ (Biolistic PDS-1000/He, Fa. Biorad) mit Druck in die obere Epidermis einer Gemüsezwiebel geschossen. Der Druck in diesem Gerät wurde durch Heliumgas bis zu 1300 psi (pound-force per square inch, 1psi = 6,894 Pascal) auf der Anzeige gebracht. Die Beschleunigung wurde mit Hilfe eines Plastikfilters („rupture disk“), der einem Druck von bis zu 1100 psi (laut Herstellerangaben) stand hält, eingesetzt. Die Probe wurde auf einen „Makro-Träger“ aufgetragen und in das Gerät eingesetzt. Zur besseren Streuung der Gold-DNS und damit der „Makro-Träger“ nicht weiter fliegt, wurde unter der Probe ein Metallnetz eingelegt. Die Kammer der „Partikelkanone“ wurde vor der Beschleunigung durch eine Vakuumpumpe evakuiert. Der Gasdruck bricht die „rupture disk“. Die Druckwelle beschleunigt den „Makro-

Träger“ mit der darauf befindlichen Probe, bis er auf das Metallnetz (=Stoppnetz) trifft. Die beladenen Goldpartikel fliegen ungebremst auf das Pflanzenmaterial zu und dringen in das Gewebe der Zwiebel ein. Am nächsten Tag waren die grünfluoreszierenden Zellen durch das Fluoreszenzmikroskops (Fa. Zeiss) mit einem GFP-Filter detektierbar.

6.7.4 Fluoreszenzmikroskopie

Das während der Inkubation der Zwiebelepidermis synthetisierte fluoreszierende SCL-GFP-Fusionsprotein wurde am nächsten Tag unter UV-Anregung je mit einer 10-fachen bzw. 16-fachen Vergrößerung im Gewebe betrachtet und fotografiert. Die Anregung des GFP und Filterung der GFP-emittierten Fluoreszenz erfolgte mit einem Filter der Anregungswellenlänge von 485 nm und der Emission von 515 nm bis 565 nm. Zellen, die die GFP-Fusionskonstruktion exprimierten, wurden mit einer Kamera dokumentiert.

6.7.5 Histochemische GUS-Analysen

- *X-Gluc-Lösung*
100 mM NaH_2PO_4 ; 25mM Na_2HPO_4 ; pH 7,3; 0,5% Triton X; 0,5% X-Gluc
- *Milchsäure-Lösung*
100% Milchsäure; 20% Glycerin; 30% 1 x PBS
- 70 % EtOH

Das Pflanzenmaterial aus Linien der Prom-GUS-Linien bzw. DR5-GUS-Linien wurde in eine X-Gluc-Lösung eingelegt. Das GUS-Gen kodiert für β -Glukuronidase. Dieses Enzym spaltet das farblose Substrat X-Gluc. Es wurden Glukuronsäure und ein lösliches Zwischenprodukt frei, das oxidativ zu einem unlöslichen blauen Indigofarbstoff dimerisiert, der in den Zellen detektiert werden kann. Die Infiltration der X-Gluc-Lösung wurde durch ein angelegtes Vakuum von 5 Min. verstärkt. Im Anschluss wurden die infiltrierten Pflanzen bei 37°C für mehrer Stunden inkubiert und mit 70%-igem EtOH entfärbt. Danach wurden die gefärbten Pflanzenteile durch ein Binocular (Fa. Zeiss, AxioplanII) fotografiert. Die Bilder konnten durch die Software AxioVisionLE dargestellt werden. Die Regionen der Pflanze, in denen Blaufärbung zu finden waren, wurden dokumentiert.

6.7.6 Anfertigung histochemischer Schnitte

- *Infiltrationsmedium zur Einbettung von Pflanzenmaterial*
Historesin-Basisharz; 2,5% Aktivator
- *Einbettungsmedium*
15 ml Infiltrationsmedium; 6,5% Härter

Das GUS-gefärbte Pflanzenmaterial wurde für 2 Stunden bei RT in Historesin-Basisharz nach Herstellerangaben eingebettet. Nach 40-60 Min. war das Harz mit dem darin befindlichen Pflanzenmaterial ausgehärtet und wurde mit Hilfe eines Rotations-Mikrotoms (Fa. Micros, CUT 4060) 10 μm dünn geschnitten und mikroskopisch analysiert.

6.7.7 Ein-Hybrid Analyse in Zwiebelepidermiszellen

Das System wurde in Anlehnung an das Protoplasten Two-Hybrid-System (Ehlert et al. 2006) entwickelt. Eine DNS Bindedomäne, die an die GAL4-UAS des Vektors GAL4-UAS₄::GUS bindet, wurde an das zu untersuchende Protein fusioniert. Kann das Protein transaktivieren, kommt es zur Expression des *GUS* Gens. Um die Transformation zu normalisieren wurde eine Pro35S::NAN Konstruktion verwendet (Kirby et al. 2002). Das SCL8 Volllängen und vier Deletionen wurden mit fünf Oligonukleotid-Paaren („8 ATG“ / „8 -TGA“, „8 270 f“ / „8 640 r“, „8 373 f“ / „8 684 r“, „8 481 f“ / „8 684 r“, und „8 481 f“ / „8 807 r“) aus cDNS amplifiziert. Die Sequenzen wurden über den pENTR/D-TOPO Eingangsvektor in den „Zielvektor“ p35SGBD-GW ligiert, wo das mit der DNS-Bindedomäne fusionierte Gen durch den 35S-CaMV-Promotors exprimiert wurde.

6.7.8 Histochemischer Nachweis von NAN- und GUS-Aktivität

- *X-NeuNAc-X-GlucM-Färbelösung*
0,5 mM X-Neu; 1 mM X-GlucM; 0,1 M Phosphat-Puffer; pH 7,3

Zwiebelepidermiszellen, denen durch ballistischen Transfer (Abschnitt 3.7) die Plasmide pROK219-NAN und pROK219-GUS eingebracht wurde, waren am nächsten Tag in eine Färbelösung aus 0,5 mM X-NeuNAc und 1 mM X-GlucM überführt worden und 3 Min. im Excikator evakuiert. Die beiden Farbstoffe ermöglichen es die Aktivität des *NAN* und *GUS* Gens zu visualisieren. Im Anschluß wurden diese Zwiebel-Fragmente im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Die Zellen die *NAN* exprimierten waren blau gefärbt, *GUS* Aktivität wird durch eine Magenta-Färbung indiziert. Zellen, in denen sowohl *NAN* als auch *GUS* exprimiert werden, waren durch ihre Lila-Färbung erkennbar, durch die vorhandenen Blau- und Magenta-Pigmente entstehen (Kirby et al. 2002).

6.8 Sequenzanalyse

Sequenzdaten wurden durch das Programm DNASTar (Fa. Lasergene) analysiert. Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm „Basic Local Alignment Search Tool“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt.

6.9 Datenbanken

Die Microarray-Analysen sowie der Vergleich verschiedener Geneexpressionen, sowie der Gen-Korrelation wurden mit dem Programm „Meta-Profile Analysis“ auf der Internet-Seite <https://www.genevestigator.ethz.ch> (Zimmermann et al. 2004) und dem Programm „efp-Browser“ der Seite www.bbc.botany.utoronto.ca (Werner et al. 2007) durchgeführt.

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
A	Adenin
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	Abscissinsäure
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxyl Säure
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäurerest
Asp	Asparginsäure
ATP	Adenosine 5'-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BCI _{red}	Brom-Chlor-Indolyl-Hydroxyd
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Celsius
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus
cDNS	komplementäre DNS
cm	Zentimeter
CPRG	Chlorphenolrot-β-D-Galactopyranosid
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammonium-Bromid
CuSO ₄	Kupfersulfat
DB	Bindedomäne
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease I
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosit Triphosphat
DTE	Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetracetic Säure Fe-(III)-Na-Salz
EMS	Ethyl-Methansulfonat

EtBr	Ethidiumbromid
Eth	Ethylen
EtOH	Ethanol
f'	forward (=vorwärts)
g	Gramm
GA ₃	Gibberellinsäure
GAL4	β-Galaktosidase
GFP	grünfluoreszierendes Protein
Gluc	Glukose
Gly	Glycin
Gm	Gentamycin
GUS	β-Glukuronidase
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-Ethanschwefelsäure)
His	Histidin
IAA	Indole-3-Essigsäure
IgG	Immunoglobulin G
IGPD	Imidazol-Glycerin-Phosphat-Dehydratase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
KAc	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
Kana	Kanamycin
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	“left border“ einer T-DNS Insertion
LB Medium	Luria-Bertani Medium
Leu	Leucin
Li	Lithium
LiAc	Lithiumacetat
LiCl	Lithiumchlorid
Lys	Lysin
mA	Milliamper
Mb	Megabasen
MES	2-Morpholinoethanesulfatsäure
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat

Min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNS	Boten-RNS
MS	Murashige-Skoog
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogen-Phosphat
NAA	Naphthylessigsäure
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Mono-Natriumphosphat-1-Hydrat
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
NES	Kernexportsignal
ng	Nanogramm
NH ₄ Ac	Ammonium-Acetat
NH ₄ NO ₃	Ammoniumnitrat
Ni-NTA	Nickel-Nitril-3-Essigsäure
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
NPA	N-1-Naphthylphthalamidsäure
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAA	Polyacrylamid
PAC	Paclobutrazol
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-Puffer-Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
psi	“Pfund-Kraft pro Quadratzoll” “pound-force per square inch”
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
R	Arginin
r'	reverse (=rückwärtig)
RB	“Right-Border”
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonucleinsäure
rRNS	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SC-leu-trp	Synthetisches Komplettmedium ohne Leucine und Tryptophan
SDS	Natriumdodecyl Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gelelektrophorese

Sek.	Sekunden
Spek.	Spektinomycin
β-Gal	β-Galaktosidase
Strep.	Streptomycin
Suc	Sucrose
T	Thymin
TAP	Tris-Acetat Puffer
T-DNS	Transfer-DNS
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'- Tetra-Methylethylen-Diamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
t-RNS	Transfer-RNS
U	Uracil
ÜNK	Übernachtskultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen per Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewicht per Volumen
X-GAL	5-Brom-4-Chlor-3-Indol-β-D-Galaktopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indol-β-D-Glucuron-Säure
X-GlucM	5-Brom-6-Chlor-3-Indolyl-β-D-Glucuronid
X-NeuNAc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-α-D-N-Acetylneuraminsäure
YPAD	Hefe-Pepton-Adenin-Hemisulfat
ZnCl ₂	Zinkchlorid

Literaturverzeichnis

1. **Abeles, A. L.** Biochemical Pathway of Stress-induced Ethylene. *Plant Physiol.* 1972 Oct,50(4):496-498.
2. **Abou-Mandour, A. A.** Studies on *Ruta graveolens* ssp. *divaricata*. *Planta Med.* 1982 Oct,46(10):105-9. German
3. **Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Moritz, T., Harberd, N. P.** The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 10,104(15):6484-9. Epub 2007 Mar 26.
4. **Achard, P., Vriezen, W. H., Van Der Straeten, D., Harberd, N. P.** Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell.* 2003 Dec,15(12):2816-25. Epub 2003 Nov 13.
5. **Adam, S. A., Lobl, T. J., Mitchell, M. A., Gerace, L.** Identification of specific binding proteins for a nuclear location sequence. *Nature.* 1989 Jan 19,337(6204):276-9.
6. **Adams, D. O., Yang, S. F.** Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Jan,76(1):170-174.
7. **Aida, M., Vernoux, T., Furutani, M., Traas, J., Tasaka, M.** Roles of *PIN-FORMED* and *MONOPTEROS* in pattern formation of the apical region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 129, 3965-3974, 2002.
8. **Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M., Ullrich, C. I.** Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta.* 2003 Mar,216(5):841-53. Epub 2002 Nov 26.
9. **Araki, T.** Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr Opin Plant Biol.* 2001 Feb,4(1):63-8. Review.
10. **Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., Leon, P.,** Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development* 14: 2085-2096, 2000.
11. **Auldrige, M. E., Block, A., Vogel, J. T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D., McCarty, D. R., and Klee, H. J.** Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant J.* 2006 Mar, 45(6):982-93.
12. **Avsian-Kretschmer O., Cheng J. C., Chen L. Q., Moctezuma, E., Sung, Z. R.** Indole acetic acid distribution coincides with vascular differentiation pattern during *Arabidopsis* leaf ontogeny. *Plant Physiol* 130: 199–209, 2002
13. **Balázquez, M. A., Weigel D.** Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature.* 2000 Apr 20,404(6780):889-92.
14. **Bechthold, N., Ellis, J. and Pelletier, G.** In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. 1993 CR. Acad. Sci. Paris Life Sci. 316, 1194–1199.
15. **Balquez, MA., Soowal, LN., Lee, I., Weigel, D.** LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development.* 1997 Oct,124(19):3835-44.
16. **Barth, C., Tullio, M., Patricia L., Conklin, P. L.** The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 8, 1657–1665, 2006

17. **Bastow, R., Mylne, JS., Lister, C., Lippman, Z., Martienssen, R. A., Dean, C.** Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* 2004 427(6970):164-7.
18. **Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F., Giraudat, J.** Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell*. 2000 Jul,12(7):1103-15
19. **Beeckman, T., Burssens, S., Inzé, D.** The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 52, Roots Special Issue, pp. 403-411, 2001
20. **Benfey, P. N., Linstead, P. J., Roberts, K., Schiefelbein, J. W., Hauser, M. T., and Aeschbacher, R. A.** Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development*. 1993 Sep, 119(1):57-70.
21. **Bennett, T., Sieberer, T., Willett, B., Booker, J., Luschnig, C., and Leyser, O.** The *Arabidopsis* MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr Biol*. 2006 Mar 21, 16(6):553-63.
22. **Berger, F., Hung, CY., Dolan, L., Schiefelbein, J.** Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Dev Biol*. 1998 Feb 15,194(2):235-45.
23. **Berleth, T., Krogan, N. T., and Scarpella, E.** Auxin signals turning genes on and turning cells around. *Curr Opin Plant Biol*. 2004 Oct, 7(5):553-63.
24. **Bhalerao, R. P., Eklof, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., and Sandberg, G.** Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*. 2002 Feb, 29(3):325-32.
25. **Bleecker, A. B., Kende, H.** **Ethylene:** a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000, 16:1-18.
26. **Bolle, C.** The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta*. 2004 Mar, 218(5):683-92.
27. **Bolle, C., Koncz, C., Chua, N. H.** PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev*. 2000 May 15,14(10):1269-78.
28. **Booker, J., Sieberer, T., Wright, W., Williamson, L., Willett, B., Stirnberg, P., Turnbull, C., Srinivasan, M., Goddard, P., and Leyser, O.** MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell*. 2005 Mar, 8(3):443-9.
29. **Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H., and Leyser, O.** MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol*. 2004 Jul 27, 14(14):1232-8.
30. **Booker, J., Chatfield, S., Lyser, O.,** Auxin acts in xylem-associated or medullary cells to mediate apical dominance. *Plant Cell* 15: 495-507, 2003
31. **Calkhoven, C. F., Ab G.** Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem J*. 1996 Jul 15,317 (Pt 2):329-42. Review.
32. **Cary, A. J., Liu, W., and Howell, S. H.** Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol*. 1995 Apr, 107(4):1075-82.
33. **Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., Bennett, MJ.** Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci*. 2003 Apr,8(4):165-71. Review.
34. **Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D.C.** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. In: *Science*. Band 263, 1994, S. 802-805.

35. **Chandler, J., Wilson, A., Dean, C.** Arabidopsis mutants showing an altered response to vernalization. *Plant J.* 1996 Oct,10(4):637-44.
36. **Chao, L., Vargas, C., Spear, B. B., Cox EC.** Transposable elements as mutator genes in evolution. *Nature.* 1983 Jun 16-22,303(5918):633-5.
37. **Chatfield, S. P., Stirnberg, P., Forde, B. G., Leyser, O.** The hormonal regulation of axillary bud growth in Arabidopsis. *Plant J.* 2000 Oct,24(2):159-69.
38. **Chen, Y. F., Etheridge, N., and Schaller, G. E.** Ethylene signal transduction. *Ann Bot (Lond).* 2005 May, 95(6):901-15.
39. **Chen, Y. F., Randlett, M. D., Findell, J. L., and Schaller, G. E.** Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *J Biol Chem.* 2002 May 31, 277(22):19861-6.
40. **Chien, C. T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., Fields, S.** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 1,88(21):9578-82.
41. **Clark, SE.** Meristems: start your signaling. *Curr Opin Plant Biol.* 2001 Feb,4(1):28-32. Review.
42. **Clark, D. G., Gubrium, E. K., Barrett, J. E., Nell, T. A., and Klee, H. J.** Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiol.* 1999 Sep, 121(1):53-60.
43. **Cline, M. G., Oh, C.,** A reappraisal of the role of abscisic acid and its interaction with auxin in apical dominance. *Ann Bot (Lond).* 2006 Oct,98(4):891-7. Epub 2006 Aug 1.
44. **Clough, S. J., Bent, A. F.** Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated Transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 1998 Dec,16(6):735-43
45. **Collett, C. E., Harberd, N. P., Leyser, O.** Hormonal interactions in the control of Arabidopsis hypocotyl elongation. *Plant Physiol.* 124, 553–562. 2000
46. **Copley, R. R., Russell, R. B.** Getting the most from your protein sequence. *Methods Mol Biol.* 2003,211:411-30.
47. **Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., Coupland, G.** FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science*, 2007 May 18,316(5827):1030-3., 2007
48. **Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Estelle, M.** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature.* 2005 May 26,435(7041):441-5
49. **De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inzé, D., Foyer, CH., Zhang, H.** An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis. *Plant J.* 2003 Feb(3):543-55.
50. **del Pozo, J. C., Estelle, M.** Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends Plant Sci.* 1999 Mar, 4(3):107-112.
51. **Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A., Benfey, P. N.** The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell.* 1996 Aug 9, 86(3):423-33.
52. **Dill, A., Jung, H. S., Sun, T. P.** The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 20,98(24):14162-7
53. **Dolan, L., Janmaat, K., Willemsin, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B.** Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root, *Development* 119, (71-84), 1993.

54. **Doust, A. N.** Grass architecture: genetic and environmental control of branching. *Curr Opin Plant Biol.* 2007 Feb,10(1):21-5. Epub 2006 Nov 30.
55. **Dubrovsky, J. G., Gambetta, G. A., Hernandez-Barrera, A., Shishkova, S., and Gonzalez, I.** Lateral root initiation in Arabidopsis: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann Bot (Lond).* 2006 May, 97(5):903-15.
56. **Dubrovsky, J. G., Doerne, P. W., Colón-Carmona, A., Rost, T. L.** Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2000 Dec,124(4):1648-57.
57. **Ecker, J. R., Davis, R. W.** Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987 Aug,84(15):5202-5206. PMID: 16593860 [PubMed - as supplied by publisher]
58. **Ehlert, A., Weltmeier, F., Wang, X., Mayer, C. S., Smeekens, S., Vicente-Carbajosa, J., Dröge-Laser, W.** Two-hybrid protein-protein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *Plant J.* 2006 Jun,46(5):890-900. PMID: 16709202
59. **Etheridge, N., Chen, Y. F., and Schaller, G. E.** Dissecting the ethylene pathway of Arabidopsis. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2005 Feb, 3(4):372-81.
60. **Etheridge, N., Hall, B. P., and Schaller, G. E.** Progress report: ethylene signaling and responses. *Planta.* 2006 Feb, 223(3):387-91.
61. **Evans, M. L.** The action of auxin on plant cell elongation. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 1985,2(4):317-65. Review. No abstract available.
62. **Feng, S., Shen, Y., Sullivan, J. A., Rubio, V., Xiong, Y., Sun, T. P., Deng, X. W.** Arabidopsis CAND1, an unmodified CUL1-interacting protein, is involved in multiple developmental pathways controlled by ubiquitin/proteasome-mediated protein Degradation. *Plant Cell.* 2004 Jul,16(7):1870-82.
63. **Fields, S., Song, O. A** novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 1989 Jul 20,340(6230):245-6.
64. **Finkelstein, R. R.** Maternal Effects Govern Variable Dominance of Two Abscissic Acid Response Mutations in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* 1994 Aug, 105(4):1203-1208.
65. **Finkelstein, R. R., Somerville, C. R.** Three Classes of Abscissic Acid (ABA)-Insensitive Mutations of Arabidopsis Define Genes that Control Overlapping Subsets of ABA Responses. *Plant Physiol.* 1990 Nov,94(3):1172-1179.
66. **Fos, M., Proaño, K, Nuez, F, García-Martínez, J. L.** Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system pat-3/pat-4 in tomato. *Physiol Plant.* 2001 Apr,111(4):545-550.
67. **Friml, J., Benfey, P., Benková, E., Bennett, M., Berleth, T., Geldner, N., Grebe, M., Heisler, M., Hejátko, J., Jürgens, G., Laux, T., Lindsey, K., Lukowitz, W., Luschnig, C., Offringa, R., Scheres, B., Swarup, R., Torres-Ruiz, R., Weijers, D., Zazimalová, E.** Apical-basal polarity: why plant cells don't stand on their heads. *Trends Plant Sci.* 2006 Jan,11(1):12-4. Epub 2005 Dec 13. Review. No abstract available.
68. **Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jurgens, G.** Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature.* 2003 Nov 13, 426(6963):147-53.
69. **Fu, X., Sudhakar, D., Peng, J., Richards, D. E., Christou, P., and Harberd, N. P.** Expression of Arabidopsis GAI in transgenic rice represses multiple gibberellin responses. *Plant Cell.* 2001 Aug, 13(8):1791-802.

70. **Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Kato, T., Fujisawa, H., Benfey, P. N., Tasaka, M.** Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 1998 May, 14(4):425-30.
71. **Gallagher, K. L., Paquette, A. J., Nakajima K., Benfey P. N.** Mechanisms regulating SHORT-ROOT intercellular movement. *Curr Biol.* 2004 Oct 26,14(20):1847-51.
72. **Galoch, E., Zielinska, M., Burkacka-Laukajtys, E.** The effect of decapitation on the levels of IAA and ABA in the lateral buds of *betula pendula*. *Acta Physiologiae Plantarum* 20: 399-403
73. **Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., Palme, K.** Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science.* 1998 Dec 18,282(5397):2226-30.
74. **Gamble, R. L., Qu, X., Schaller, G. E.** Mutational analysis of the ethylene receptor ETR1. Role of the histidine kinase domain in dominant ethylene insensitivity. *Plant Physiol.* 2002 Apr, 128(4):1428-38.
75. **Gao, Q., Hua, J., Kimura, R., Headd, J. J., Fu, X. Y., Chin, Y. E.** Identification of the linker-SH2 domain of STAT as the origin of the SH2 domain using two-dimensional structural alignment. *Mol Cell Proteomics.* 2004 Jul,3(7):704-14. Epub 2004
76. **Gazzarrini, S., McCourt P.** Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol.* 2001(5):387-91.
77. **Geldner, N., Friml J, Stierhof Y. D, Jürgens G, Palme K.** Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature.* 2001 Sep 27,413(6854):425-8.
78. **Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., McCourt P.** Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2000 Jul,12(7):1117-26.
79. **Gibson, SI.** Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J Exp Bot.* 2004 Jan,55(395):253-64. Epub 2003 Dec 12. Review.
80. **Gibson, SI., Laby, R., Kim, D.** The sugar-insensitive1 (*sis1*) Mutant of *Arabidopsis* is Allelic to *ctr1*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280, 196–203 (2001)
81. **Gillaspy, G., Ben-David, H., Gruissem, W.** Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell* 5, 1439-1451.1993
82. **Giraudat, J.** Absciscic acid signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 1995 Apr,7(2):232-8. Review.
83. **Goetz, M., Vivian-Smith, A., Johnson, S. D., Koltunow, A. M.** AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2006 Aug,18(8):1873-86. Epub 2006
84. **Gray, W. M., del Pozo, JC., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W. L., Yang, M., Ma, H., Estelle, M.** Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 1999 Jul 1,13(13):1678-91.
85. **Greb, T., Clarenz, O., Schafer, E., Muller, D., Herrero, R., Schmitz, G., Theres, K.** Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Dev.* 2003 May 1, 17(9):1175-87.
86. **Grebe, M., Friml, J., Swarup, R., Ljung, K., Sandberg, G., Terlou, M., Palme, K., Bennett, M. J., Scheres, B.** Cell polarity signaling in *Arabidopsis* involves a BFA-sensitive auxin influx pathway. *Curr Biol.* 2002 Feb 19, 12(4):329-34.
87. **Grbić, B., Bleecker, A. B.** An altered body plan is conferred on *Arabidopsis* plants carrying dominant alleles of two genes. *Development.* 1996 Aug,122(8):2395-2403.

88. **Grill, E., Himmelbach, A.** ABA signal transduction. *Curr Opin Plant Biol.* 1998 Oct,1(5):412-8.
89. **Guilfoyle, T.J., Hagen, G.** Auxin response factors. *J. Plant Growth Regul.* 20, 281– 291.2001
90. **Guzman, P., Ecker, J. R.** Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell.* 1990 Jun, 2(6):513-23.
91. **Hadfi, K., Speth, V., Neuhaus, G.** Auxin-induced developmental patterns in Brassica juncea embryos. *Development.* 1998 Mar,125(5):879-87.
92. **Hall, J. M., Chang, C. Y., McDonnell DP.** Development of peptide antagonists that target estrogen receptor beta-coactivator interactions. *Mol Endocrinol.* 2000 Dec,14(12):2010-23.
93. **Hamann, T., Benkova, E., Bäurle, I., Kientz, M., Jürgens G.** The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev.* 2002 Jul 1,16(13):1610-5.
94. **Hamann, T., Mayer, U., Jürgens, G.** The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the Arabidopsis embryo. *Development.* 1999 Apr,126(7):1387-95.
95. **Hansen, H., Grossmann, K.** Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiol.* 2000,124(3):1437-48
96. **Hardtke, C. S., Ckurshumova, W., Vidaurre, D. P., Singh, S. A., Stamatiou, G., Tiwari, S. B., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Berleth, T.** Overlapping and non-redundant functions of the Arabidopsis auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4. *Development.* 2004 Mar, 131(5):1089-100.
97. **Hardtke, C. S., Berleth, T.** The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* 1998 Mar 2, 17(5):1405-11.
98. **He, Y., Michaels, S. D., Amasino, R. M.** Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis. *Science.* 2003 Dec 5,302(5651):1751-4. Epub 2003 Oct 30.
99. **Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., Parker, M. G.** A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature.* 1997 Jun 12, 387(6634):733-6.
100. **Heidstra, R., Welch, D., and Scheres, B.** Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect Arabidopsis SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Dev.* 2004 Aug 15, 18(16):1964-9.
101. **Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M. T., Benfey, P. N.** The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell.* 2000 May 26, 101(5):555-67.
102. **Hepworth, S. R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A., Coupland, G.** Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J.* 2002 Aug 15,21(16):4327-37.
103. **Hertel, R., Evans, M. R., Leopold, A. C., Sell, H. M.** The specificity of the auxin transport system. *Planta,* 85, 238–249,1969.
104. **Hicks, GR., Raikhel, NV.** Nuclear localization signal binding proteins in higher plant nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jan 31,92(3):734-8.
105. **Hicks, G.R., Smith, H.M., Shieh, M., Raikhel, N.V.** Three classes of nuclear import signals bind to plant nuclei. *Plant Physiol.* 1995 Apr,107(4):1055-8.
106. **Himmelbach, A., Iten, M., Grill, E.** Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998 Sep 29, 353(1374):1439-44.

107. **Hobbie, L., Estelle, M.** Genetic approaches to auxin action. *Plant Cell Environ.* 1994 Jun,17(6):525-40. Review.
108. **Hong, S. B., Sexton, R., and Tucker, M. L.** Analysis of gene promoters for two tomato polygalacturonases expressed in abscission zones and the stigma. *Plant Physiol.* 2000 Jul, 123(3):869-81
109. **Hua, J., Meyerowitz, E. M.** Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell.* 1998 Jul 24, 94(2):261-71.
110. **Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q. G., Bleecker, A. B., Ecker, J. R., and Meyerowitz, E. M.** EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 1998 Aug, 10(8):1321-32.
111. **Huala E., Sussex I. M.** LEAFY Interacts with Floral Homeotic Genes to Regulate *Arabidopsis* Floral Development. *Plant Cell.* 1992 Aug,4(8):901-913.
112. **Ingram, G. C., Goodrich, J., Wilkinson, M. D., Simon, R., Haughn, G. W., Coen, E. S.** Parallels between UNUSUAL FLORAL ORGANS and FIMBRIATA, genes controlling flower development in *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *Plant Cell.* 1995 Sep,7(9):1501-10.
113. **Itoh, H., Sasaki, A., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Hasegawa, Y., Minami, E., Ashikari, M., Matsuoka, M.** Dissection of the phosphorylation of rice DELLA protein, SLENDER RICE1. *Plant Cell Physiol.* 46:1392-1399,2005
114. **Itoh, H., Matsuoka, M., Steber, C. M.** A role for the ubiquitin-26S-proteasome pathway in gibberellin signaling. *Trends Plant Sci.* 2003 Oct,8(10):492-7. Review.
115. **Jacobsen, S. E., Binkowski, K. A., Olszewski, N. E.** SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9292–9296, 1996
116. **Jean, R. V.** A synergic approach to plant pattern generation. *Math Biosci.* 1990 Feb,98:13-47.
117. **Jefferson, R. A., Kavanagh, T.A., Bevan, M. W.** GUS fusions:beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*1987 Dec20,6(13):3901-7.
118. **Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A.** GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 2002 May,7(5):193-5.
119. **Kays, A. R., Schepartz, A.** Virtually unidirectional binding of TBP to the AdMLP TATA box within the quaternary complex with TFIIA and TFIIB. *Chem Biol.* 2000 Aug,7(8):601-10.
120. **Kende, H., Zeevaart, J. A. D.** The five “classical” plant hormones. *The Plant Cell*, Vol. 9, 1197-1210, 1997
121. **Kepinski, S., Leyser, O.** The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature.* 2005 May 26, 435(7041):446-51.
122. **Kepinski, S., Leyser, O.** Plant development: an axis of auxin. *Nature.* 2003 Nov 13, 426(6963):132-5.
123. **Kepinski, S., Leyser, O.** Plant development: auxin in loops. *Curr Biol.* 2005 Mar 29, 15(6):R208-10.
124. **Kepinski, S., Leyser, O.** Ubiquitination and auxin signaling: a degrading story. *Plant Cell.* 2002, 14 Suppl:S81-95.
125. **Kieber, J., Rotehnberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., Ecker, J., CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the RAF family of protein kinases**

126. **Kirby, J., Kavanagh, T. A.** NAN fusions: a synthetic sialidase reporter gene as a sensitive and versatile partner for GUS. *Plant J.* 2002 Nov,32(3):391-400.
127. **Klee, H.** Hormones are in the air. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 2, 100(18):10144-5.
128. **Koornneef, M., Hanhart, C. J., Hilhorst, H. W., Karssen, C. M.** In Vivo Inhibition of Seed Development and Reserve Protein Accumulation in Recombinants of Absciscic Acid Biosynthesis and Responsiveness Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 1989 Jun, 90(2):463-469.
129. **Koornneef, M., Hanhart, C. J., van der Veen, J. H.** A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet.* 1991 Sep,229(1):57-66.
130. **Kuhlemeier, C.** Phyllotaxis. *Trends Plant Sci.* 2007 Apr,12(4):143-50. Epub 2007 Mar 26.
131. **Kuhlemeier, C., Reinhardt, D.** Auxin and phyllotaxis. *Trends Plant Sci.* 2001 May,6(5):187-9.
132. **Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680–685, 1970.
133. **Laskowski, M. J., Williams, M. E., Nusbaum, H. C., Sussex, I. M.** Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development.* 1995 Oct, 121(10):3303-10.
134. **Lazar, G., Goodman, H.** *MAX 1*, a regulator of the flavonoid pathway, controls vegetative axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *PNAS* 103: 472-476, 2006
135. **Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N. P., Peng, J.** Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* 2002 Mar 1, 16(5):646-58.
136. **Lee H., Xiong L., Ishitani M., Stevenson B., Zhu J. K.** Cold-regulated gene expression and freezing tolerance in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Plant J.* 1999 Feb,17(3):301-8.
137. **Lee, I., Wolfe, D. S., Nilsson, O., Weige, I D. A** LEAFY co-regulator encoded by UNUSUAL FLORAL ORGANS. *Curr Biol.* 1997 Feb 1,7(2):95-104.
138. **León, P., Sheen, J.** Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* 2003 Mar;8(3):110-6.
139. **Lengler, J. W., Drews, G., Schlegel, H. G.** Biology of the Prokaryotes. *Thieme* 1999, 616-22.
140. **Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G., Laux, T.** Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell.* 2001 Jun 15, 105(6):805-14.
141. **Lenhard, M., Jurgens, G., Laux, T.** The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development.* 2002 Jul, 129(13):3195-206
142. **Lenhard, M., Laux, T.** Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. *Development.* 2003 Jul, 130(14):3163-73.
143. **Leon, P., Sheen, J.** Sugar an hormone connections. *Trends in Plant Science* Vol. 8, No.3, 2003
144. **Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P. C., Guerrier, D., Cheddor, F., Giraudat, J.** *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science.* 1994 Jun 3, 264(5164):1448-52.
145. **Leung, J., Giraudat, J.** ABSCISIC ACID SIGNAL TRANSDUCTION. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1998 Jun, 49:199-222.

146. **Leung, J., Merlot, S., Gosti, F., Bertauche, N., Blatt, M. R., Giraudat, J.** The role of ABI1 in abscisic acid signal transduction: from gene to cell. *Symp Soc Biol.* 1998, 51:65-71.
147. **Leyser, H. M., Lincoln, C. A., Timpfe, C., Lammer, D., Turner, J., and Estelle, M.** Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature.* 1993 Jul 8, 364(6433):161-4.
148. **Leyser, O., Berleth, T.** A molecular basis for auxin action. *Semin Cell Dev Biol.* 1999 Apr, 10(2):131-7.
149. **Li, X., Li, X., Qian, Q., Fu, Z., Wang, Y., Xiong, G., Zeng, D., Wang, X., Liu, X., Teng, S., Hiroshi, F., Yuan, M., Luo, D., Han, B., Li, J.** Control of tillering in rice *Nature* 422, 618-621, 2003
150. **Liang, X., Abel, S., Keller, J. A., Shen, N. F., Theologis, A.** The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 15,89(22):11046-50.
151. **Lincoln, C., Britton, J. H., Estelle, M.** Growth and development of the *axr1* mutants of Arabidopsis. *Plant Cell.* 1990 Nov, 2(11):1071-80.
152. **Liptay, A., Schopfer, P.** Effect of Water Stress, Seed Coat Restraint, and Absciscic Acid upon Different Germination Capabilities of Two Tomato Lines at Low Temperature. *Plant Physiol.* 1983 Dec, 73(4):935-938.
153. **Liscum, E., Reed J.W.** Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* 49, 387–400.2002
154. **Liu, C., Xu, Z., Chua, N. H.** Auxin Polar Transport Is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis. *Plant Cell.* 1993 Jun, 5(6):621-630.
155. **Liu, L., White, MJ., MacRae., TH.** Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. *Eur J Biochem.* 1999 Jun,262(2):247-57. Review.
156. **Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.-H., Ma, L.** A G Protein-Coupled Receptor is a Plasma Membrane Receptor for the Plant Hormone Absciscic Acid.
157. **Lloyd, A. M, Barnason, A. R, Rogers, S. G, Byrne, M. C, Fraley, R. T, Horsch, R. B.** Transformation of Arabidopsis thaliana with Agrobacterium tumefaciens. *Science.* 1986 Oct 24,234(4775):464-466.
158. **López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella L.** The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol.* 2003 Jun,6(3):280-7.
159. **Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P., Barton, M. K.** The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development.* 1999 Feb, 126(3):469-81.
160. **Ma, H.** To be, or not to be, a flower-control of floral meristem identity. *Trends Genet.* 1998 Jan, 14(1):26-32.
161. **Makkerh, J. P., Dingwall, C., Laskey, R. A.** Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr. Biol.* 1996,6(8),1025-7
162. **Malamy, J. E.** Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.* 2005 Jan, 28(1):67-77.
163. **Malamy, J. E., Benfey, P. N.** Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development.* 1997 Jan,124(1):33-44.

164. **Morohashi, K., Minami, M., Takase, H., Hotta, Y., Hiratsuka, K.** Isolation and Characterization of a Novel GRAS Gene That Regulates Meiosis-associated Gene Expression. *J Biol Chem.* 2003, 278(23):20865-73.
165. **Mattsson, J., Ckurshumova, W., Berleth, T.** Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development. *Plant Physiol.* 2003 Mar, 131(3):1327-39.
166. **Mattsson, J., Sung, Z. R., Berleth, T.** Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development.* 1999 Jul, 126(13):2979-91.
167. **Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., Laux, T.** Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell.* 1998 Dec 11, 95(6):805-15.
168. **Michaels, S. D., Amasino, R. M.** FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell.* 1999 May, 11(5):949-56. PMID: 10330478
169. **Moon, J., Suh, S. S., Lee, H., Choi, K. R., Hong, C. B., Paek, N. C., Kim, S. G., Lee, I.** The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J.* 2003 Sep, 35(5):613-23. Erratum in: *Plant J.* 2004 Feb, 37(3):459.
170. **Morohashi, K., Minami, M., Takase, H., Hotta, Y., Hiratsuka K.** Isolation and characterization of a novel GRAS gene that regulates meiosis-associated gene expression. *J Biol Chem.* 2003 Jun 6, 278(23):20865-73.
171. **Mouchel, C.F., Leyser, O.** Novel phytohormones involved in long-range signaling *Current Opinion in Plant Biology* 2007, 10: 473-476
172. **Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., Benfey, P. N.** Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature.* 2001 Sep 20, 413(6853):307-11.
173. **Nawy, T., Lee, J. Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Thongrod, S. C., Malamy, J. E., Birnbaum, K., Benfey, P. N.** Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. *Plant Cell.* 2005 Jul, 17(7):1908-25.
174. **Nishiyama, T., Fujita, T., Shin-I, T., Seki, M., Nishide, H., Uchiyama, I., Kamiya, A., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., Kohara, Y., Hasebe, M.** Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Jun 24, 100(13):8007-12.
175. **Nitsch, J. P.** Hormonal factors in growth and development. In *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, vol. 1 (ed. A. C. Hulme), pp.427-472. London: Academic Press.1970
176. **Novikova, G. V., Moshkov, I. E., Smith, A. R., Hall, M. A.** The effect of ethylene on MAPKinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 2000 May 26, 474(1):29-32.
177. **Ogawa, M., Kusano, T., Katsumi, M. Sano, H.** Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclearlocalized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene*, 245, 21–29, 2000
178. **Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J., Shimura, Y.** Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation. *Plant Cell.* 1991 Jul, 3(7):677-684.
179. **Okamuro, J. K., den Boer, B. G., Jofuku, K. D.** Regulation of Arabidopsis flower development. *Plant Cell.* 1993 Oct, 5(10):1183-93. Review. No abstract available.
180. **Okushima, Y., Mitina, I., Quach, H.L., Theologis, A.** AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator, *The Plant Journal*, 2005 43, 29–46

181. **Poduska, B., Humphrey, T., Redweik., Grbic V.,** The Synergistic Activation of *FLOWERING LOCUS C* by *FRIGIDA* and a new flowering Gene *AERIAL ROSETTE 1* underlies a novel morphology in Arabidopsis. *Genetics* 163: 1457-1465, 2003.
182. **Palme, K., Gälweiler, L.** PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Curr Opin Plant Biol.* 1999 Oct,2(5):375-81.
183. **Pandey, S., Assmann, S.** The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* 16, 1616–1632. 2004
184. **Pandolfini, T., Molesini, B., Spena A.** Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends Plant Sci.* 2007 Aug,12(8):327-9. Epub 2007 Jul 12.
185. **Paponov, I. A., Teale, W. D., Trebar, M., Blilou, I., Palme, K.** The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci.* 2005 Apr, 10(4):170-7.
186. **Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M. A., Lee, I., Weigel, D.** A genetic framework for floral patterning. *Nature.* 1998 Oct 8,395(6702):561-6.
187. **Parsons, B. L., Mattoo, A. K.** Wound-regulated accumulation of specific transcripts in tomato fruit: interactions with fruit development, ethylene and light. *Plant Mol Biol.* 1991 Sep, 17(3):453-64.
188. **Pearce, D., Taylor, J., Robertson, J., Harker, K., Daly, E.** Changes in abscisic acid and indole-3-acetic acid in axillary buds of *Elytrigia repens* released from apical dominance. *Physiologia Plantarum* 94: 110-116
189. **Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., Harberd, N. P.** The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* 1997 Dec 1, 11(23):3194-205.
190. **Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J. W., Gale, M. D., Harberd, N. P.** 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature.* 1999 Jul 15, 400(6741):256-61.
191. **Peng, J., Richards, D. E., Moritz, T., Cano-Delgado, A., Harberd, N. P.** Extragenic suppressors of the Arabidopsis gai mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol.* 1999 Apr, 119(4):1199-208.
192. **Petrasek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J. J., Abas, M., Seifertova, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanova, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benkova, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O. R., Fink, G. R., Geisler, M., Murphy, A. S., Luschnig, C., Zazimalova, E., Friml, J.** PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science.* 2006 May 12, 312(5775):914-8.
193. **Phillips, I.** Apical dominance. *Annual review of Plant Physiology* 26: 342-367
194. **Poduska, B., Humphrey, T., Redweik, A., Grbić, V.** The synergistic activation of *FLOWERING LOCUS C* by *FRIGIDA* and a new flowering gene *AERIAL ROSETTE 1* underlies a novel morphology in Arabidopsis. *Genetics.* 2003 Apr,163(4):1457-65
195. **Putterill, J., Laurie, R., Macknight, R.** It's time to flower: The genetic control of flowering time. *Bioessays* 26, 363–373. 2004
196. **Przemeck, G. K., Mattsson, J., Hardtke, C. S., Sung, Z. R., Berleth, T.** Studies on the role of the Arabidopsis gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta.* 1996, 200(2):229-37.

197. **Pysh, L. D., Wysocka-Diller, J. W., Camilleri, C., Bouchez, D., Benfey, P. N.** The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J.* 1999 Apr, 18(1):111-9.
198. **Quirino, B. F., Normanly, J., Amasino, R. M.** Diverse range of gene activity during Arabidopsis thaliana leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol Biol.* 1999 May, 40(2):267-78.
199. **Razem, F., El-Kereamy, A., Abrams, S., Hill, R.** The RNA binding protein, FCA, is an abscisic acid receptor. *Nature* 439, 290–294. 2006
200. **Razem, F., Luo, M., Liu, J.-H., Abrams, S., Hill, R.** Purification and characterization of a barley aleurone abscisic acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 279, 9922–9929. 2006
201. **Rademacher, W.** GROWTH RETARDANTS: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2000 Jun, 51:501-531.
202. **Raikhel, N.** Nuclear Targeting in Plants. *Plant Physiol.* 1992 Dec, 100(4):1627-1632. No abstract available.
203. **Reinhardt, D., Pesce, E. R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J., Kuhlemeier, C.** Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature.* 2003 Nov 20, 426(6964):255-60.
204. **Reinhardt, D., Mandel, T., Kuhlemeier, C.** Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell.* 2000 Apr, 12(4):507-18.
205. **Richards, D. E., Peng, J., and Harberd, N. P.** Plant GRAS and metazoan STATs: one family? *Bioessays.* 2000 Jun, 22(6):573-7.
206. **Robertson, A. J., Ishikawa, M., Gusta, L. V., MacKenzie, S. L.** Abscisic acid-induced heat tolerance in Bromus inermis Leyss cell-suspension cultures. Heat-stable, abscisic acid-responsive polypeptides in combination with sucrose confer enhanced thermostability. *Plant Physiol.* 1994 May, 105(1):181-90.
207. **Rock, C. D., Sun, X.** Crosstalk between ABA and auxin signaling pathways in roots of Arabidopsis thaliana (L.) Planta. 2005 Sep, 222(1):98-106, 2005
208. **Roe, J. L., Rivin, C. J., Sessions, R. A., Feldmann, K. A., Zambryski, P. C.** The Tousled gene in A. thaliana encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. *Cell.* 1993 Dec 3, 75(5):939-50.
209. **Romano, C. P., Cooper, M. L., Klee, H. J.** Uncoupling Auxin and Ethylene Effects in Transgenic Tobacco and Arabidopsis Plants. *Plant Cell.* 1993 Feb, 5(2):181-189.
210. **Romano, C. P., Robson, P. R., Smith, H., Estelle, M., Klee, H.** Transgene-mediated auxin overproduction in Arabidopsis: hypocotyl elongation phenotype and interactions with the hy6-1 hypocotyl elongation and axr1 auxin-resistant mutants. *Plant Mol Biol.* 1995 Mar, 27(6):1071-83.
211. **Romano, C. P., Hein, M. B., Klee, H. J.** Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of Pseudomonas savastanoi. *Genes Dev.* 1991 Mar, 5(3):438-46.
212. **Ruonala, R., Rinne, P. L., Baghour, M., Moritz, T., Tuominen, H., Kangasjärvi, J.** Transitions in the functioning of the shoot apical meristem in birch (Betula pendula) involve ethylene. *Plant J.* 2006 May, 46(4):628-40.
213. **Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., Scheres, B.** SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes Dev.* 2003 Feb 1, 17(3):354-8.

214. **Sakai, H., Hua, J., Chen, Q. G., Chang, C., Medrano, L. J., Bleecker, A. B., Meyerowitz, E. M.** ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 12, 95(10):5812-7.
215. **Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M. F., Coupland, G.** Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science*. 2000 Jun 2, 288(5471):1613-6.
216. **Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T.** *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. 1989.
217. **Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., and Laux, T.** Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature*. 2007 Apr 12, 446(7137):811-4.
218. **Sauer, M., Balla, J., Luschnig, C., Wisniewska, J., Reinöhl, V., Friml, J., Benková, E.** Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. : *Genes Dev*. 2006,20(20):2902-11.
219. **Scheres, B., Berleth, T.** Root development: new meanings for root canals? *Curr Opin Plant Biol*. 1998 Feb, 1(1):32-6.
220. **Schiavone, F. M., Racusen, R. H.** Regeneration of the root pole in surgically transected carrot embryos occurs by position-dependent, proximodistal replacement of missing tissues. *Development*. 1991 Dec, 113(4):1305-13.
221. **Schiefelbein, J. W., Masucci, J. D., Wang, H.** Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell*. 1997 Jul, 9(7):1089-98.
222. **Schmid, M., Davison, T. D., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D., Lohmann, J. U.** A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development *Nature Genetics* 37, 501 - 506 (2005)
223. **Schneider, K., Wells, B., Dolan, L., Roberts, K.** Structural and genetic analysis of epidermal cell differentiation in Arabidopsis primary roots. *Development*. 1997 May, 124(9):1789-98.
224. **Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F., Jurgens, G., Laux, T.** The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*. 2000 Mar 17, 100(6):635-44.
225. **Schultz, E. A., Haughn, G. W.** LEAFY, a Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 1991 Aug, 3(8):771-781.
226. **Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., Theres, K.** The *Lateral suppressor (Ls)* gene of tomato encodes a new member of the VHLID protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci* 290-295, 1996
227. **Schwartz, S. H., Qin, X., Loewen, M. C.** The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from Arabidopsis indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J Biol Chem*. 2004 Nov 5, 279(45):46940-5.
228. **Schwartz, S. H., Leon-Kloosterziel, K. M., Koornneef, M., Zeevaart, J. A.** Biochemical characterization of the aba2 and aba3 mutants in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*. 1997 May, 114(1):161-6.
229. **Sena, G., Jung, J. W., and Benfey, P. N.** A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development*. 2004 Jun, 131(12):2817-26.
230. **Seo, M., Koshiba, T.,** Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* Vo.7 No.1 2002

231. **Shani, E., Yanai, O., Ori, N.** The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr Opin Plant Biol.* 2006 Oct,9(5):484-9.
232. **Shargool, P. D., Steeves, T., Weaver, M., Russell, M.** The localization within plant cells of enzymes involved in arginine biosynthesis. *Can J Biochem.* 1978 Apr, 56(4):273-9.
233. **Sheldon, C. C., Rouse, D. T., Finnegan, E. J., Peacock, W. J., Dennis, E. S.** The molecular basis of vernalization: the central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28,97(7):3753-8.
234. **Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N., Sun, T.** The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell.* 1998 Feb, 10(2):155-69.
235. **Simon, V., Schumann, W.** In vivo formation of gene fusions in *Pseudomonas putida* and construction of versatile broad-host-range vectors for direct subcloning of Mu d1 and Mu d2 fusions. *Appl Environ Microbiol.* 1987 Jul,53(7):1649-54
236. **Simpson, G.G., Gendall, A.R., Dean, C.** When switch to flowering. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999, 99: 519-50
237. **Snowden, K., Simkin, A., Janssen, B., Templeton, K., Loucas, H., Simons, J.,** The decreased apical dominance/petunia hybrida *CAROTINOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8* gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth and flower development. *Plant Cell* 17: 746-759, 2005
238. **Sondel, P. M., Hank, J. A., Trigg, M. E., Kohler, P. C., Finlay, J. L., Blank, J., Meisner, L., Borchering, W., Hong, R., Steeves, R.,** Transplantation of HLA-haploidentical T-cell-depleted marrow for leukemia: autologous marrow recovery with specific immune sensitization to donor antigens. *Exp Hematol.* 1986 May, 14(4):278-86.
239. **Sorefan, K., Booker, J., Haurogne, K., Goussot, M., Bainbridge, K., Foo, E., Chatfield, S., Ward, S., Beveridge, C., Rameau, C., Leyser, O.** MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev.* 2003 Jun 15, 17(12):1469-74.
240. **Steeves, T. A., Gabriel, H. P., Steeves, M. W.** Growth in Sterile Culture of Excised Leaves of Flowering Plants. *Science.* 1957 Aug 23, 126(3269):350-351.
241. **Stirnberg, P., van De Sande, K., Leyser, H. M.** MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development.* 2002 Mar, 129(5):1131-41.
242. **Stirnberg, P., Chatfield, S. P., Leyser, H. M.** AXR1 acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 1999 Nov,121(3):839-47.
243. **Stuurman, J., Jaggi, F., Kuhlemeier, C.** Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes Dev.* 2002 Sep 1, 16(17):2213-8.
244. **Suh, Y. J, Park, T, Cheong, S. Y.** Linkage analysis of longitudinal data. *BMC Genet.* 2003 Dec 31,4 Suppl 1:S27. PMID: 14975095
245. **Sussex, I. M., Godoy, J. A., Kerk, N. M., Laskowski, M. J., Nusbaum, H. C., Welsch, J. A., Williams, M. E.** Cellular and molecular events in a newly organizing lateral root meristem. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1995 Oct 30, 350(1331):39-43.
246. **Sussex, I. M., Steeves, T. A.** Growth of excised fern leaves in sterile culture. *Nature.* 1953 Oct 3, 172(4379):624-5.
247. **Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., Bennett, M.** Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes Dev.* 2001 Oct 15, 15(20):2648-53.

248. **Talbert, P. B., Adler, H. T., Parks, D. W., Comai, L.** The REVOLUTA gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 1995 Sep, 121(9):2723-35.
249. **Talon, M., Zacarias, L., Primo-Millo, E.** Gibberellins and Parthenocarpic Ability in Developing Ovaries of Seedless Mandarins. *Plant Physiol*. 1992 Aug,99(4):1575-1581.
250. **Tamas, I. A., Engels, C.J.** Role of Indoleacetic Acid and Absciscic Acid in the Correlative Control by Fruits of Axillary Bud Development and Leaf Senescence. *Plant Physiol*. 1981 Aug,68(2):476-481.
251. **Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N., Hasezawa, S.** Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*.2006,57(10):2259-66. Epub 2006 Jun 23
252. **Tantikanjana T., Yong J. W., Letham DS., Griffith M., Hussain M., Ljung K., Sandberg G., Sundaresan V.** Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the SUPERSHOOT gene. *Genes Dev* 15: 1577–1588, 2001
253. **Taylor, J. E., Renwick, K. F., Webb, A. A., McAinsh, M. R., Furini, A., Bartels, D., Quatrano, R.S., Marcotte, W. R Jr., Hetherington, A. M.** ABA-regulated promoter activity in stomatal guard cells. *Plant J*. 1995 Jan,7(1):129-34.
254. **Teale, W. D., Paponov, I. A., Palme, K.** Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Nov, 7(11):847-59.
255. **Teeri, T. H., Lehv slaiho, H., Franck, M., Uotila, J., Heino, P., Palva, E. T., Van Montagu, M., Herrera-Estrella, L.,** Gene fusions to lacZ reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. *EMBO J*. 1989 Feb;8(2):343-50.
256. **Thimann, K. V., and Skoog, F.** On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in *Vicia faba*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 114, 317–339.1934
257. **Timp te, C., Lincoln, C., Pickett, F. B., Turner, J., Estelle, M.** The AXR1 and AUX1 genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-response pathways. *Plant J*. 1995, 8(4):561-9.
258. **Tiwari, S. B., Hagen, G., Guilfoyle, T.** The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell*, 15, 533–543. 2003
259. **Tobias, C. A., Blakely, E. A., Alpen, E. L., Castro, J. R., Ainsworth, E. J., Curtis, S. B., Ngo, F. Q., Rodriguez, A., Roots, R. J., Tenforde, T., Yang, T. C.** Molecular and cellular radiobiology of heavy ions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1982 Dec, 8(12):2109-20.
260. **Torres-Galea, P., Huang, L. F., Chua, N. H., Bolle, C.** The GRAS protein SCL13 is a positive regulator of phytochrome-dependent red light signaling, but can also modulate phytochrome A responses. *Mol Genet Genomics*. 2006 Jul, 276(1):13-30.
261. **Torrey, J. G.** The Role of Vitamins and Micronutrient Elements in the Nutrition of the Apical Meristem of Pea Roots. *Plant Physiol*. 1954 May, 29(3):279-87.
262. **Trejo, C. L., Clephan, A. L., Davies, W. J.** How Do Stomata Read Absciscic Acid Signals? *Plant Physiol*. 1995 Nov, 109(3):803-811.
263. **Tucker, M. L., Whitelaw, C. A., Lyssenko, N. N., Nath, P.** Functional analysis of regulatory elements in the gene promoter for an abscission-specific cellulase from bean and isolation, expression, and binding affinity of three TGA-type basic leucine zipper transcription factors. *Plant Physiol*. 2002 Nov, 130(3):1487-96.
264. **Tucker, M.** Manuell: Apical dominance in the tomato: the possible roles of auxin and abscisin acid. *Plant Science Letters* 12: 273-278, 1978

265. **Ueda, M., Koshino-Kimura, Y., Okada, K.** Stepwise understanding of root development. *Curr Opin Plant Biol.* 2005 Feb, 8(1):71-6.
266. **Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle T. J.** Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J.* 1999 Aug,19(3):309-19.
267. **Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle, T. J.** ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, 276, 1865–1868. 1997a
268. **Ulmasov, T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T. J.** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell.* Nov,(11):1963-71. 1997b
269. **Ulmasov, T., Liu Z. B., Hagen G., Guilfoyle T. J.** Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell.* 1995 Oct,7(10):1611-23.
270. **Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., Coupland, G.** Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein and the Mechanism of Photoperiodic Flowering. *Science* 303: 1003-1006, 2004
271. **van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., Scheres, B.** Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signalling. *Nature.* 1995 Nov 2, 378(6552):62-5.
272. **Vidal, M., Braun, P., Chen, E., Boeke, J. D., Harlow, E.** Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 17,93(19):10321-6.
273. **Vivian-Smith, A., Luo, M., Chaudhury, A., Koltunow, A.** Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development* 128, 2321-2331, 2001
274. **Vivian-Smith, A., Koltunow, A. M.** Genetic analysis of growthregulator-induced parthenocarp in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 121, 437-452.1999
275. **Wang, S. Y., Sun, T., Faust, M.** Translocation of Paclobutrazol, a Gibberellin Biosynthesis Inhibitor, in Apple Seedlings. *Plant Physiol.* 1986 Sep,82(1):11-14.
276. **Wang, S. Y., Tung Sun Zuo, L., Miklos, F.** Effect of Paclobutrazol on Water Stress-Induced Absciscic Acid in Apple Seedling Leaves *Plant Physiol.* 1987 August, 84(4):1051–1054.
277. **Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F., Meyerowitz, E. M.** LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell.* 1992 May 29,69(5):843-59.
278. **Wen, C. K., Chang, C.** Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell.* 2002 Jan, 14(1):87-100.
279. **Willige, B. C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E. M., Maier, A., Schwechheimer, C.** The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell.* 2007 Apr,19(4):1209-20.
280. **Wilkinson, M. D., Haughn, G. W.** UNUSUAL FLORAL ORGANS Controls Meristem Identity and Organ Primordia Fate in Arabidopsis. *Plant Cell.* 1995 Sep, 7(9):1485-1499.
281. **Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., Provart, N. P.** An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* 2(8): e718.
282. **Wisniewska, J., Xu, J., Seifertova, D., Brewer, P. B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquie, D., Benkova, E., Scheres, B., Friml, J.** Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science.* 2006 May 12, 312(5775):883.

283. **Woodward, A. W., Ratzel, S. E., Woodward, E. E., Shamoo, Y., Bartel, B.** Mutation of E1-CONJUGATING ENZYME-RELATED1 decreases RELATED TO UBIQUITIN conjugation and alters auxin response and development. *Plant Physiol.* 2007 Jun,144(2):976-87. Epub 2007 Apr 20.
284. **Wysocka-Diller, J. W., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J. E., Benfey, P. N.** Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development.* 2000 Feb, 127(3):595-603.
285. **Xia, HJ., Brearley, C., Elge, S., Kaplan, B., Fromm, H., Mueller-Roeber, B** Arabidopsis inositol polyphosphate 6-/3-kinase is a nuclear protein that complements a yeast mutant lacking a functional ArgR-Mcm1 transcription, complex. *Plant Cell* 15: 449–463, 2003
286. **Zeevaart, J. A. D., Creelman, R. A.** Metabolism an physiology of abscisic acid. *annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 439-473
287. **Zhang, Z. B., Yang, G., Arana, F., Chen, Z., Li, Y., Xia H. J.,** Arabidopsis Inositol Polyphosphate 6-/3-Kinase (*At/pk2β*) is involved in Axillary Shoot branching via Auxin Signaling. *Plant Physiology*, Vo. 144, 942-951, 2007.
288. **Zhao, X. C., Qu, X., Mathews, D. E., Schaller, G. E.** Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2002 Dec, 130(4):1983-91.
289. **Zhong, R., Ye, Z. H.** Alteration of auxin polar transport in the Arabidopsis ifl1 mutants. *Plant Physiol.* 2001 Jun, 126(2):549-63.
290. **Zhou L., Jang J. C., Jones T. L., Sheen J.** Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Aug 18,95(17):10294-9.
291. **Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., Gruissem W.** GENEVESTIGATOR, *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* 2004 Sep,136(1):2621-32. Erratum in: *Plant Physiol.* 2004 Dec,136(4):4335.

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Herrmann und seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. Leister für die Möglichkeit am Botanischen Institut an meiner Dissertation zu arbeiten.

Bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. Cordelia Bolle für die Betreuung meiner Arbeit, sowie die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Danke für die immerwährende Geduld und Bereitschaft zur Diskussion.

Frau Dr. Angelika Böttger danke ich für das Anfertigen des zweiten Gutachtens dieser Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Christine Matzenbacher, Ingrid Duschaneck, Martina Reymers, und Anina Neumann bedanke ich mich für die technische Unterstützung innerhalb des Laboralltags. Ihre tollen selbstgebackenen Kuchen haben immer mal wieder den Laboralltag versüßt haben und deren stetige Hilfsbereitschaft den Laboralltag entscheidend erleichtert haben.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei Julia, für ihre immerwährenden Bereitschaft zum wissenschaftlichen und philosophischen Austausch und die „tiefgreifenden“ Erkenntnisse über Unken, Nager und Nagerartige.

Ein Dankeschön auch an Andrea, die während ihrer Diplomarbeit zu diesem Thema beigetragen hat. Danke sagen möchte ich auch zu meiner Vielzahl an Laborkollegen mit denen ich im Laufe der Jahre in diesem Labor arbeiten durfte: Lada, Pavan, Elli, Jarda, Martina Silber, Astrid, Steffi, Elina und natürlich ganz besonders Martha und Uwe, die mich immer wieder aufgemuntert haben.

Bei meiner lieben Kollegin Patrizia möchte ich mich besonders für die schöne Zeit im Labor bedanken und der essentiellen Erkenntnis, dass Katalanen eigentlich keine Spanier sind. Außerdem hatten ihr Optimismus und ihre offene und herzliche Art großen Anteil an unserem super „Laborklima“. Schade, dass wir als Team nicht zusammen bleiben können.

Ich möchte auch die Gelegenheit nutzen, mich bei meinen Freunden zu bedanken, die mir all die Jahre zur Seite standen mit aufmunternden Worten zur Seite standen.

Großer Dank auch meinen Eltern für die stetige Anerkennung dessen was ich tue. Sie haben mich immer motiviert und unterstützt. Klaudia danke ich herzlich für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Mann Rainer. Nicht nur für seine langjährige Unterstützung in jeglicher Hinsicht, sondern auch für sein Verständnis und seine Geduld in den letzten Jahren. Er musste einiges „mitmachen“ in dieser Zeit. Ich verdanke ihm mehr, als ich hier zusammenfassen kann.